Aus der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik
Innere Medizin der Kleintiere und klinische Laboratoriumsdiagnostik
und der Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Innere Medizin und Chirurgie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Softwareadaptation und begleitende Evaluation des Hämatologiesystems ADVIA 120 für die Tierart Rind; Erstellung von hämatologischen Referenzbereichen für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und deutsches Fleckvieh.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Mark Holsteg

Gießen 2002

Aus der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik
Innere Medizin der Kleintiere und klinische Laboratoriumsdiagnostik
und der Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Innere Medizin und Chirurgie; Prof. Dr. K. Doll
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Hochschuldozent Dr. A. Moritz

Softwareadaptation und begleitende Evaluation des Hämatologiesystems ADVIA 120 für die Tierart Rind; Erstellung von hämatologischen Referenzbereichen für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und deutsches Fleckvieh.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Mark Holsteg
Tierarzt aus Wesel

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:	Prof. Dr. Dr. h. c. Bernd Hoffmann
1. Berichterstatter:	HDoz. Dr. Andreas Moritz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Doll
Tag der mündlichen Prüfung:	2. Juli 2002



Meinem Vater

INHALTSVERZEICHNIS

Im Text verwendete Abkürzungen

Abb.	=	Abbildung
abs.	=	absolut
ANAE	=	α-Naphtylacetat Esterase (Färbung)
Basophile G.	=	Basophile Granulozyten
bzw.	=	beziehungsweise
CHCM	=	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten *(engl.= Corpuscular Haemoglobin Concentration Mean)*
CV	=	Variationskoeffizient *(Coefficent of Variation)*
d	=	Mittelwert der Differenz
d.h.	=	das heißt
DSB	=	schwarzbunte Holstein
eosinophile G.	=	Eosinophile Granulozyten
et al.	=	et alii
F-800	=	Sysmex F-800
Fa.	=	Firma
fl	=	Femtoliter
fmol	=	Femtomol
h	=	Stunden *(hours)*
H*1	=	Technicon H*1
HDW	=	Hämoglobinverteilungsbreite *(Haemoglobin Distribution Width)*
HCT	=	Hämatokrit *(Hematocrit)*
HGB	=	Hämoglobin *(Haemoglobin)*
ICSH	=	Internationales Kommittee für Standardisierung in der Hämatologie *(International Committee for Standardization in Haematology)*
J.	=	Jahre
K_3-EDTA	=	Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure
k.a.	=	keine Angabe
Kap.	=	Kapitel
Li	=	Lithium
LUC	=	Große Peroxidase Negativ Gefärbte Zellen *(Large Unstained Cells)*
Lympho	=	Lymphozyten
MCH	=	Mittlerer Zellulärer Hämoglobingehalt *(Mean Corpuscular Haemoglobin)*
MCHC	=	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten *(engl .= Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration)*
MCV	=	Mittleres Erythrozytenvolumen *(Mean Corpuscular Volume)*
MN	=	Mononukleäre Zellen *(Mononucleated Cells)*
MPV	=	Mittleres Thrombozytenvolumen *(Mean Platelet Volume)*

Abkürzungsverzeichnis

n	=	Probenzahl
Na	=	Natrium
n. b.	=	nicht bestimmt
NCCLS	=	Nationales Kommittee für Klinische Labor-Standards *(National Committee for Clinical Laboratory Standards)*
Neutrophile G.	=	Neutrophile Granulozyten
PAN	=	Panoptische Färbung nach Pappenheim
PDW	=	Thrombozyten Volumenverteilungsbreite *(Platelet Volume Distribution Width)*
PLT	=	Thrombozytenzahl *(Platelet Count)*
PMN	=	Polymorphnukleäre Zellen *(Polymorphnucleated Cells)*
POX	=	Peroxidase (Färbung)
r	=	Korrelationskoeffizient
RBC	=	Erythrozytenzahl ((*Red Blood Cells) Red Cell Count)*
rd	=	relative Differenz
RDW	=	Erythrozyten(volumen)verteilungsbreite *(Red Cell Volume Distribution Width)*
s	=	Standardabweichung
s.	=	siehe
S.	=	Seite
SB	=	schwarzbunte Holstein
sd	=	Standardabweichung der Differenz
s_{in}	=	Streuung innerhalb der Probe
Tab.	=	Tabelle
u.a.	=	unter anderem
µl	=	Mikroliter
vgl.	=	vergleiche
W-LCC	=	absolute Zahl der großen Leukozyten
W-LCR	=	relative Zahl der großen Leukozyten
W-SCC	=	absolute Zahl der kleinen Leukozyten
W-SCR	=	relative Zahl der kleinen Leukozyten
WBC	=	Leukozyten(gesamt)zahl *((White Blood Cells) Total Leucocyte Count)*
$\overline{x}$	=	Mittelwert

Abkürzungsverzeichnis

1 EINLEITUNG

Die Untersuchung von Blutbildern gibt dem Untersucher wertvolle Hinweise in der Diagnostik von Krankheiten. So zeigen sich bei vielen Rinderkrankenheiten pathognostische Veränderungen der Blutkörperchen in ihrer Zahl und/ oder in ihren morphologischen Eigenschaften (STÖBER und GRÜNDER, 1990).

Die technische Weiterentwicklung von automatischen Laboreinheiten zur Erstellung umfangreicher Blutbilder eröffnet der Medizin neue diagnostische Möglichkeiten. Vor dem Einsatz dieser Systeme steht eine ausführliche klinische Validierung aller relevanten Parameter an jeder einzelnen für dieses System vorgesehenen Spezies. Dabei muß das Augenmerk gleichermaßen auf etablierte Parameter, wie auch auf neue Parameter, die nach genormten Richtlinien evaluiert werden, gerichtet sein. In dieser Arbeit werden für das Rind neben bekannten hämatologischen Parametern neue Meßgrößen der Thrombozyten- und Retikulozytenzählung beschrieben.
Die Interpretation von Untersuchungsergebnissen setzt voraus, daß Referenzbereiche exsistieren. Um hier Lücken bei der Tierart Rind zu schließen, wurden mit dem Multiparameter Hämatologiesystem ADVIA 120 Referenzbereiche für neue und bekannte hämatozytologische Parameter erstellt.
Intention dieser Arbeit ist es, den ADVIA 120 für die Tierart Rind zu evaluieren und darüber hinaus altersabhängige hämatologische Referenzbereiche für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und deutsches Fleckvieh zu erstellen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Geschichtlicher Überblick

Die Erforschung des Blutes ist seit der Beschreibung der Blutkugeln von Borelli im Jahre 1656 durch zunehmendes Verständnis für die Funktion seiner Bestandteile und der Entwicklung immer präziser werdender Untersuchungsmethoden zu einem wichtigen Bestandteil der Diagnostik geworden. In Tabelle 01 sind die geschichtlichen Fortschritte der Hämatologie bis zur Entwicklung des ersten Automaten durch Coulter zusammengetragen.

Tab. 01: Zeittafel der Blutzellanalytik und Blutzelldiagnostik
(aus Praktische Blutzelldiagnostik, BOROVICZENY, 1991)

Jahr	Name	Sachverhalt
1656	Borelli	beschreibt als erster die Blutkugeln
1658	Swammerdamm	führt systematische mikroskopische Untersuchungen durch
1665	Malpighi	hält Blutkörperchen im Omentum für Fettkügelchen
1674	Leuwenhock	beobachtet Blutzellveränderungen während seiner Krankheit
1717	Jurin	ermittelt den Erythrozytendurchmesser
1732	Hales	findet ungenügend Blutkugeln bei einer Blutungsanämie
1743	Schwencke	veröffentlicht `Haematologia sive sanguinis historia`
1744	Schurigius	veröffentlicht `Haematologia historico-medico`
1744	Sauvages	vermutet farbige Moleküle in den Blutkügelchen
1753	Rhades	weist Eisen in den roten Blutkörperchen nach
1756	Haller	veröffentlich ausführliche Monographie über das Blut
1765	Stiles, Torre	beschreiben die Delle der roten Blutkörperchen
1782	Levison	warnt vor Aderlass wegen Abnahme der Erythrozytenzahl
1818	Home	entdeckt die Blutplättchen

Fortsetzung Tab. 1:

Jahr	Name	Sachverhalt
1827	Hodgkin, Lister	beschreiben die Lymphogranulomatose
1830	Denis	bestimmt die Hämoglobinkonzentration
1831	Lecanu	findet niedrigere Hb-Normalwerte bei der Frau
1839	Nasse	zeichnet ein Bild der segmentkernigen Granulozyten
1840	Gulliver	führt Erythrozytenstudien bei 485 Tierspezies durch
1846	Virchow	Bedeutung der farblosen Blutkörperchen in der Pathologie
1852	Vierordt	beschreibt eine Erythrozytenzählmethode
1854	Welker	beschreibt eine Leukozytenzählmethode
1863	Recklinghausen	beobachtet die Eigenbewegung der Leukozyten
1865	Schulze	differenziert im Nativausstrich fünf Leukozytenarten
1868	Neumann	entdeckt Blutzellbildung im Knochenmark
1877	Ehrlich	beginnt seine Leukozytenfärbestudien
1902	May u. Grünwald	beschreiben die nach ihnen benannte Färbemethode
1902	Giemsa	beschreibt die nach ihm benannte Färbemethode
1902	Sahli	beschreibt das nach ihm benannte Hämometer
1905	Bürker	beschreibt die bis heute gebräuchliche Zählkammer
1908	Pappenheim	gründet die Berliner Hämatologische Gesellschaft
1912	Schilling	führt das seither praktizierte Differentialblutbild ein
1928	Pelger u. Huet	beschreiben die Segmentierungsanomalie
1933	Heilmeyer	veröffentlicht die Medizinische Spektrophotometrie
1948	Langerkranz	beschreibt ein mechanisiertes Blutzellzählgerät
1956	Coulter	erhält ein Patent auf ein mechanisiertes Blutzellzählgerät

Die Verwendung der Blutzellzählung und insbesondere der Blutzelldifferenzierung zu diagnostischen Zwecken hat nach der in Tabelle 01 aufgestellten Zeittafel auch in der Tiermedizin sehr schnell Beachtung gefunden. Trotzdem hat es bis in die 90er Jahre des 20. Jahrhunderts gedauert, bis automatische Systeme in der Tiermedizin für verschiedene Tierspezies eingeführt wurden.

2.2 Hämatologische Meßtechniken

Die folgenden Kapitel geben einen Einführung in die Möglichkeiten der hämatologischen Untersuchungsmethoden. Neben den manuellen Methoden werden die automatischen Verfahren dargestellt. Dabei stellt die Beschreibung der automatischen Systeme den größeren Anteil in diesem Kapitel.

2.2.1 Manuelle Blutzellzählung

Die Zählkammer wird zur Zellzählung von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten verwendet. Das Blut wird mit speziellen Mischpipetten 1 : 200 (Erythrozyten), 1 : 100 (Thrombozyten) oder 1 : 10 (Leukozyten) verdünnt. Die Zellen werden in der jeweiligen Verdünnung mit Hilfe von Zählkammer und Mikroskop ausgezählt. Die Zählkammer ist ein Glasblock mit zwei eingeschliffenen Kammern von 0,1 mm Tiefe. In den Boden der Kammern ist ein Gitternetz (Zählnetz) eingraviert (NIEPAGE, 1974). Von den verschiedenen Zählkammersystemen, die entwickelt worden sind, soll hier kurz die Verwendung der verbesserten Zählkammer nach Neubauer beschrieben werden. Abbildung 1 zeigt die seitliche Ansicht und die Aufsicht der Neubauer Zählkammer.

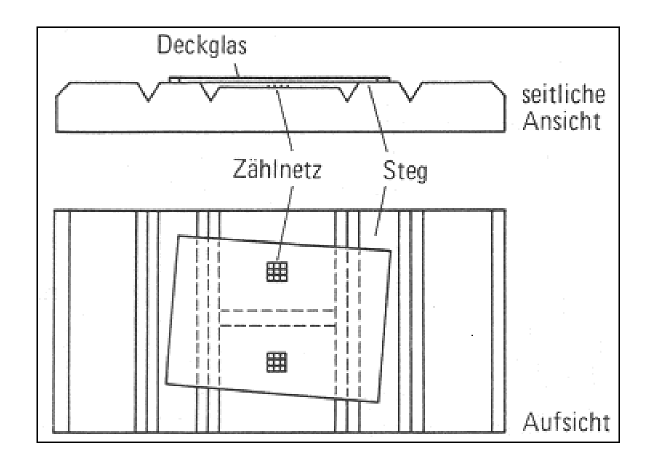


Abb. 01: Neubauer Zählkammer

Das Zählnetz der verbesserten Neubauer-Kammer ist durch Linien in neun gleich große Quadrate von je 1 mm^2 aufgeteilt. Die vier Eckquadrate dienen der Leukozytenzählung. In diesen vier Quadraten werden jeweils alle Zellen gezählt, die innerhalb der Dreifachlinienbegrenzung liegen und die Mittlere dieser Linien nicht berühren. Von den Zellen, die auf der mittleren Dreifachbegrenzungslinie liegen, werden an zwei aneinander grenzenden Seiten die Zellen mitgezählt, welche die mittlere Begrenzungslinie berühren. Die Berechnung der Zellzahl pro µl Blut erfolgt nach der Formel:

$$\frac{\mathbf{ZL \times a \times b}}{\mathbf{c}}$$

In der Formel muß für ZL die Zahl der gezählten Zellen eingesetzt werden, a ist der Verdünnungsfaktor (10), und für b muß der Multiplikationsfaktor (10) eingesetzt werden, der die Schichthöhe der Kammer von 0,1 mm auf 1 mm umrechnet. C ist die Anzahl der ausgezählten Quadrate (4).

Die Erythrozytenzahl wird im mittleren Quadrat der neun Felder ermittelt. Dazu werden fünf der 25 Unterquadrate ausgezählt, wobei die Felder ausgezählt werden, die das Quadrat diagonal durchlaufen. Wie bei der Leukozytenzählung bestimmt die Lage einer Zelle zur Seitenlinie, ob sie mit in die Berechnung einbezogen wird. Die Formel für die Berechnung der Erythrozytenzahl pro µl Blut lautet:

$$\frac{ZE \times a \times b \times d}{c}$$

ZE ist die Gesamtzahl der gezählten Erythrozyten und d steht für die Anzahl der Quadrate innerhalb des Erythrozytenzählfeldes (konstanter Faktor 2).

Zur Bestimmung der Thrombozytenzahl wird nach Hämolyse der Erythrozyten die Zählkammer beschickt und im Phasenkontrast bzw. Hellfeldverfahren bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Zur Bewertung kommen fünf Gruppenquadrate von zusammmen 0,02 µl Volumen. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\frac{ZTx20}{0,02}.$$

Die Formel setzt sich zusammen aus der gezählten Thrombozytenzahl (ZT), der Verdünnungsstufe (1:20) und dem Volumen der ausgezählten Quadrate (HALLMANN, 1980).

Die Ergebnisse der Kammerzählung unterliegen einer großen Variation, da sowohl die Verteilung der Zellen in der Kammer als auch die Handhabung von Pipette und Zählkammer eine erhebliche Fehlerquelle darstellen (BERKSON et al., 1940). Niepage rechnet bei sorgfältiger Ausführung der Methode mit einem Fehler von 5 % (NIEPAGE, 1974).

2.2.2 Bestimmung der Hämoglobinkonzentration

Der Gehalt an Hämoglobin im Blut wird photometrisch ermittelt. Die von NIEPAGE (1974) angegebene kolorimetrische Methode, bei der eine visuelle Erfassung der Farbintensität von Hämoglobin oder seiner Verbindungen mit dem Auge erfolgt, gilt heute als obsolet.
Bei der heute gebräuchlichen Hämiglobincyanidmethode werden die Erythrozyten lysiert, der rote Blutfarbstoff freigesetzt und mittels Kaliumhexacyanoferrat(III) zu Hämiglobin oxidiert. Durch die Reaktion mit Kaliumcyanid entsteht ein stabiler Hämiglobincyanidkomplex. Das Absorptionsmaximum dieser Verbindung liegt bei einer Wellenlänge von 546 nm. Aus der ermittelten Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Transformationslösung wird die Hämoglobinkonzentration errechnet (STOBBE, 1991).

2.2.3 Manuelle Blutzelldifferenzierung

Die manuelle Differenzierung von Blutzellen erfolgt an einem gefärbten Blutausstrich. Hierzu kann natives und auch antikoaguliertes Blut verwendet werden. Auf einem staubfreien, entfetteten Objektträger wird an einer Schmalseite ein Bluttropfen aufgetragen und mit einem geschliffenen Ausstrichglas im Winkel von 40° über den Objektträger gezogen. Der Ausstrich ist gelungen, wenn die Blutfahne nicht die Ränder und das Ende des Objektträgers erreicht und weder zu dünn noch zu dick ist (UNDRITZ, 1972).
Zur Färbung des luftgetrockneten Objektträgers stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim (s. Kapitel 3.1.5.1) und die Färbung nach Wright sind panoptische Färbungen zur Routinediagnostik. Spezialfärbungen zur Identifizierung einzelner Zellgruppen sind die Supravitalfärbung zur Darstellung der Retikulozyten, die Peroxidasefärbung zur Darstellung der zellulären Peroxidase in den Granula der Granulozyten und die α−Naphtyl-Esterase-Färbung zur besseren Identifikation der Monozyten (s. Kapitel 3.1.5.2 – 3.1.5.4).
Die Differenzierung der Blutausstriche ist durch eine geschulte Person durchzuführen, wobei stundenlanges Mikroskopieren zu vermeiden ist, um Fehler aufgrund nachlassender Konzentration so gering wie möglich zu halten. Der Objektträger wird nach der makroskopischen Begutachtung vorzugsweise mit einem binokularen Mikroskop zunächst mit dem 10fachen Objektiv durchgemustert, um eine Übersicht über Verteilung und Anordnung der Blutzellen zu erhalten. Anschließend werden im Ausstrich mit Ölimmersion und einem 40/50er- oder 100er–Objektiv folgende Befunde aufgenommen:

1. Erythrozytenmorphologie (Größe, Gestalt, Farbe, Einschlüsse, Vorstufen)
2. Leukozytenmorphologie und prozentuale Verteilung
3. Qualitative Veränderungen der Granulozyten (Granulation, Einschlüsse)
4. Qualitative Veränderungen der Lymphozyten
5. Qualitative Veränderungen der Monozyten
6. Auftreten von Vorstufen, Blasten oder nicht klassifizierbaren Zellen
7. Thrombozytenmorphologie (Verteilung, Aggregate, Größe, Formen)

Zur Beurteilung dieser Kriterien wird der Ausstrich im letzten Drittel mäanderförmig durchgemustert, da hier die Zellen einzeln liegen und die Innenstruktur der Leukozyten optimal beurteilt werden kann (KOEPPEN u. HELLER, 1991; KRAFT et al., 1997).
Die Aussagekraft manuell erstellter Blutbilder ist in hohem Maße abhängig von den Fähigkeiten des Untersuchers und der Anzahl der ausgezählten Zellen (BACCUS, 1973).
Verteilungsunregelmäßigkeiten der Blutzellen infolge mangelhafter Ausstrichtechnik (BARNETT, 1933) und Interpretationsfehler bei der Differenzierung der einzelnen Blutzellgruppen (BACCUS, 1973) haben einen mehr oder weniger großen Einfluß auf die Ergebnisse. Der Statistische- oder Zufallsfehler stellt bei der Differenzierung von 100 oder 200 Blutzellen die Hauptfehlerquelle dar. Durch eine Differenzierung von 400 Zellen verdoppelt sich die Präzision, und bei einer Differenzierung von 10.000 Zellen, was nur in Automaten erreicht werden kann, wird die Präzision um das Zehnfache gesteigert (RÜMKE, 1960; RÜMKE et al., 1975).

2.3 Automatische Analyseverfahren

Die Entwicklung und Benutzung automatischer Hämatologiesysteme erfolgt mit dem Ziel, kostengünstige und präzise Ergebnisse in kurzer Zeit zu erstellen. Durch die hohen Anschaffungskosten und die Leistungsfähigkeit dieser Systeme wird ein effektiver Einsatz auf Kliniken und Großlaboratorien beschränkt. Um bei hohen Untersuchungszahlen den menschlichen Einsatz gering zu halten, müssen die Automaten konstante Resultate von gleichbleibender Qualität liefern.
Zur Erfüllung dieses Zieles sind unterschiedliche Systeme entwickelt worden, die alle nach dem Prinzip der Durchflußzytometrie arbeiten. Daher wird im folgenden, vor der Beschreibung der einzelnen Systeme, diese Technik kurz vorgestellt.

2.3.1 Durchflußzytometrie

Zur Erfassung der Zellen in einer Probe müssen diese an einem Messwandler vorbeigeführt werden. Hierzu muß die Probe verdünnt werden (EDER u. FRITSCHE, 1986). Passieren zwei oder mehrere Zellen gleichzeitig den Meßwandler, wird nur ein Signal verarbeitet. Zur Vermeidung von Koinzidenzen, wird die Verdünnung so hoch gewählt und der Durchmesser des Probenstroms auf ein Minimum reduziert, daß die Zellen einzeln erfaßt werden können (ZELMANOVIC et al., 1992). In den meisten Widerstandsmessgeräten werden englumige Kapillarröhrchen verwendet, die durch Gerinnsel in der Probe verstopfen. Dagegen wird in optischen Durchflußzytometern mit hydrodynamischer Zellfokussierung (Abbildung 2) dieses Problem umgangen. In diesen Geräten wird die verdünnte Probe von einem Mantelstrom umhüllt. Der eigentliche Probenstromfaden ist kaum größer als die Zelldurchmesser, und große Zellagglomerate ragen in den Hüllstrom hinein ohne Verstopfungen zu erzeugen. Dabei wird durch unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten der beiden Flüssigkeiten laminare Strömung erzeugt, welche eine Vermischung verhindert und eine die optischen Meßsysteme störende Wirbelbildung unterdrückt.

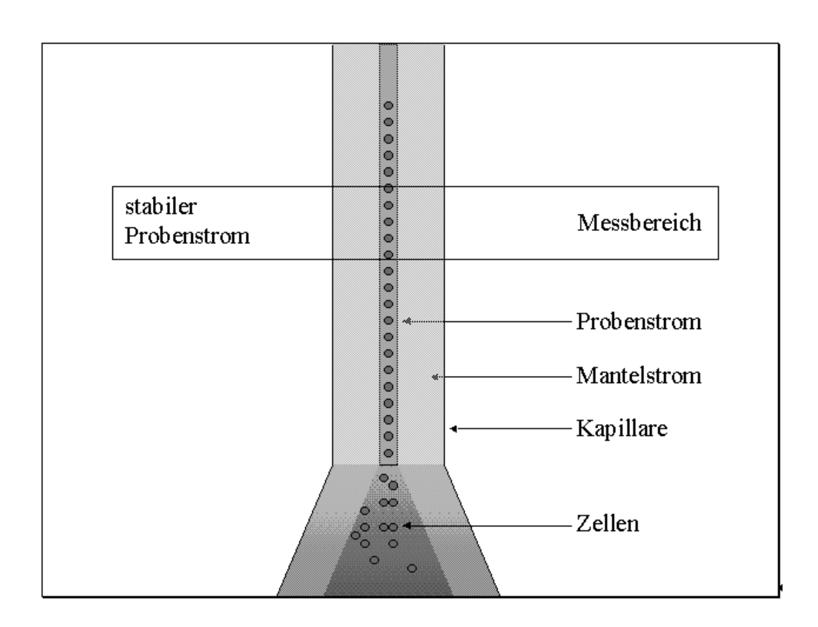


Abb. 02: Hydrodynamische Zellfokussierung

Der Mantelstrom wird in die Kapillare eingeleitet. Durch seine höhere Fließgeschwindigkeit vereinzelt er die Zellen im Probenstrom (WEBER, 1992; MORITZ, 2000).

2.3.2 Widerstandsmessung

Bei der Widerstandsmessung wird die Probe mit einer Elektrolytlösung stark verdünnt und durch eine Meßöffnung (Kapillare, Pore) geführt. Die suspendierten Partikel treten dabei von einem Flüssigkeitsraum in den nächsten über. In beiden Räumen befindet sich eine Elektrode, zwischen denen ein Gleichstrom fließt. Beim Durchtritt einer Zelle durch die Meßöffnung ändert sich, aufgrund der geringeren elektrischen Leitfähigkeit von Blutzellen gegenüber der Elektrolytlösung, kurzzeitig der elektrische Widerstand. Die impulsartige Änderung der Stromstärke erzeugt in Abhängigkeit von der Zellgröße unterschiedlich starke Signale. Dies ermöglicht es, neben der Partikelzahl auch das Volumen zu bestimmen. (EDER u. FRITSCHE, 1986).
Um unterschiedliche Signale einzelnen Zellgrößen zuzuordnen, müssen Schwellenwerte festgelegt werden. Durch die Bestimmung des unteren Schwellenwertes werden zufällige Signale, sogenannte Rauschimpulse, von der Zählung ausgeschlossen. Diese Rauschimpulse können im Extremfall das Zählgerät mit der Zellzählung überfordern (WEBER, 1992).
Die Sensitivität der Meßanordnung ist vom Verhältnis des Zellvolumens zur Kapillare abhängig. Zur sicheren Erkennung von Blutzellen ist es sinnvoll, mit unterschiedlichen Kapillarvolumina für einzelne Zellgruppen zu arbeiten. So können Impulse von optimaler Stärke erzeugt werden (WEBER, 1992).
Beim Durchtritt der Zelle durch die Kapillare wird die Zellform durch die Strömung beeinflußt. Dadurch kommt es bei der Bestimmung des mittleren Erythrozytenvolumens zu Fehlmessungen. Die Erythrozyten ändern ihre Gestalt und damit die Größe des elektrischen Signals in Abhängigkeit von der zellulären Hämoglobinkonzentration. Die Folge sind Fehler bei der Volumenmessung. Erythrozyten mit hohem Hämoglobingehalt werden vom System durchschnittlich zu groß eingeordnet (ZELMANOVIC et al., 1992).

2.3.3 Optoelektrische Meßmethode

Zur Ermittlung der Meßgrößen mit optoelektrischen Verfahren wird die verdünnte Probe in einer Durchflußküvette von einem enggebündelten Halogen- oder Laserstrahl beleuchtet. Das von den Zellen erzeugte Streulicht wird mit einem Photomultipler gemessen, die von der Zelle absorbierte Lichtmenge erfaßt eine Photodiode (EDER u. FRITSCHE, 1986; DOTSON, 1998).

Das Streulicht ist die Summe mehrerer physikalischer Effekte. Der auf die Zelle auftreffende Lichtstrahl wird von der Oberfläche teilweise reflektiert und beim Ein- und Austritt aus der Zelle gebrochen. Zusätzlich wird durch intrazelluläre Strukturen, z.B. verdichtetes Chromatin und zelluläre Granula, Licht absorbiert und gebeugt. Die Depolarisation bestimmter Wellenlängen trägt ebenfalls zur Streuung bei (WEBER, 1992).
Zur Zählung von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten wird die Beobachtung genutzt, daß die meisten mikroskopisch kleinen Partikel den größten Anteil des einfallenden Lichtes in einem Winkel von 0-15° streuen (ZELMANOVIC et al., 1992).

Bei der Erythrozyten- und Thrombozytenmessung mit den H-Systemen von Technicon und dem ADVIA 120 von Bayer müssen für reproduzierbare Ergebnisse isovolumetrisch aufgekugelte Zellen vorliegen (s. Kapitel 3.1.2.2.4) sowie eine Lichtquelle mit monochromatischem Licht und eine Zellvereinzelung durch hydrodynamische Zellfokussierung (KOSANKE, 1999). Beim ADVIA 120 und den H-Systemen von Technicon werden bei einem Winkel von 2-3 ° die Volumensignale und bei einem solchen von 5-15 ° die Dichtesignale (Hämoglobingehalt) des Zellinhaltes von Erythrozyten empfangen. Die Bestimmung der einzelnen Erythrozytenparameter erfolgt mittels der Mie-Theorie.
Bei der kombinierten Messung von Streulicht und Absorption wird das Streulicht von zytochemisch angefärbten Lekozyten zur Bestimmung des Volumens verwendet und die Färbeintensität mittels der Absorbtion gemessen (BAYER CORPORATION, 1999). In Abbildung 3 ist die Funktionsweise einer Durchflußküvette zur Zählung von Leukozyten schematisch dargestellt.

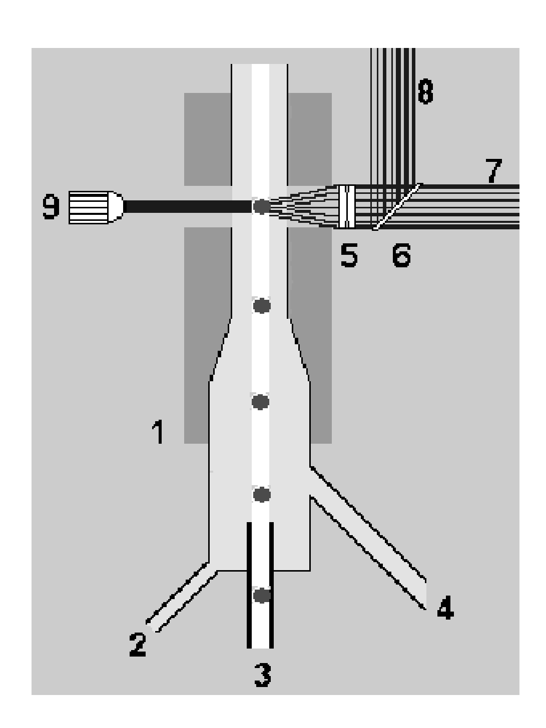


Abb. 03: ADVIA 120 - Messung von Absorbtion und Streulicht an gefärbten Leukozyten (aus ADVIA (TM) 120 Hematology System Benutzerhandbuch: Willkommen bei ADVIA 120 V1.03.00 Copyright © 1997, 1998 Bayer Corporation)

Die Abbildung zeigt die Flußzelle (1), die hier grau unterlegt ist. Der Kanal für die Vorspülung ist mit der Zahl 2 gekennzeichnet. Der Probenstrom wird über den mittleren Zufluß (3) in die Flußzelle eingeleitet. Nummer 4 bezeichnet den Einstrom für die Mantelstromflüssigkeit. Das Licht der Halogenlampe (9) wird über die Linse (5) gebündelt und über den Spiegel (6) teilweise umgelenkt, so daß an den Positionen, die mit 7 (Absorptionsmessung) und 8 (Streulichtmessung) gekenzeichnet sind, die Lichtsignale jeder Zelle gemessen werden können.

2.4 Evaluationsrichtlinien

Vor dem klinischen Einsatz von automatischen Laborgeräten sollte immer eine ausführliche Evaluation stehen. Das Ziel einer Evaluation ist die Herstellung eines Gerätestandards, der es ermöglicht, Ergebnisse verschiedener Laboratorien und unterschiedlicher Gerätetypen vergleichbar zu machen. Die Ergebnisse einer Evaluation dienen dem Benutzer dieser Systeme als Sicherheit, daß das Gerät die vom Hersteller angegebenen Leistungen erbringt (VON RÜCKER et al., 1994; MORITZ, 1999).
Zur Durchführung von Evaluationen an Hämatologiesystemen für den Einsatz in der Humanmedizin ist von der Sektion Hämatologie der Arbeitsgruppe Geräteevaluation und der Arbeitsgruppe Labor-Hämatologie der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 1994 das "Evaluationsprotokoll für hämatologische Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräte" (VON RÜCKER et al., 1994) erarbeitet worden. Ebenfalls aus dem Jahr 1994 stammen die Richtlinien des International Committee for Standardization (ICSH: "Guidelines for evaluation of blood cell analysers including those used for differential leukozyte and reticulocyte counting and cell marker applications" (ENGLAND et al., 1994), bei denen es sich um eine Überarbeitung der Richtlinien ("Protocol for evaluation of automated bloodcell counters") aus dem Jahre 1984 handelt.

Von RÜCKERT (1994) teilt in Anlehnung an ENGLAND (1984) die Evaluation in fünf Arbeitsschritte, die im Folgenden dargestellt werden.
In der **Vorphase** werden die Einrichtungen (mindestens drei = Multicenter Evaluation), welche die Evaluation durchführen, ausgewählt und ein ausführliches Prüfprotokoll mit einem detailliertem Zeit- und Finanzierungsplan erstellt.
In der **Prüfphase I** erfolgt die Ausbildung des Personals am Gerät, was vom Hersteller durchgeführt werden soll. Die Wirkungsweise und Zusammensetzung der Reagenzien muß dargelegt, Hinweise auf Umweltbelastung gegeben und ein Nachweis über die Erfüllung der in Deutschland geltenden Sicherheitsbestimmungen geführt werden. Die Auswahl von Vergleichsmethoden und Kontrollmaterial zur Überprüfung der Richtigkeit einer Messung bildet den Kernpunkt der Phase I. In Tabelle 2 sind die international und national derzeit anerkannten Methoden aufgeführt.

Tab. 02: International und national anerkannte Referenzmethoden und Kontrollmaterialien zur Überprüfung der Richtigkeit für die Blutzellzählung und -differenzierung (ENGLAND et al., 1994; VON RÜCKER et al., 1994).

Parameter	Referenzmethode	Referenzmaterial
Hämoglobin-konzentration	Hämiglobincyanid-Methode, NCCLS-Protokoll H15-A, ICSH-Empfehlung in Clin. Lab, Haemat. 9,73 (1987) DIN 58931 (1995)	Hämoglobin-Cyanid-Standard (ICSH) BCR (European Community Bureau of Reference)
Hämatokrit	Zentrifugations-Methode NCCLS-Protokoll H7-A, ICSH-Empfehlung in J. Clin. Pathol. 33, 1 (1980) DIN 58933-1 (1995)	Frischblut Surrogatmaterial: semi-stabiles Blut (z.B. ACD-Blut)
Erythrozyten-konzentration	Elektronische Impulszählung im Durchflußzytometer ICSH-Empfehlung in Clin. Lab. Haemat., 10, 203 (1988) DIN 58932-1, -2, -3, 58934-1 (1996, 1998, 1994, 1997)	Frischblut Surrogatmaterial: partiell-stabile Erythrozytenpräparationen (z.B. fixierte ´stabi` Zellen)
Leukozyten-konzentration	Elektronische Impulszählung im Durchflußzytometer nach Lyse der Erythrozyten ICSH-Empfehlung in Clin. Lab. Haemat., 10, 203 (1988) DIN 58934-1 (1997)	Frischblut, Surrogatmaterial: fixierte, nicht-lysierbare Erythrozyten, fixierte Leukozyten
Thrombozyten-konzentration	Zählkammer oder elektronische Impulszählung im Durchflußzytometer nach Koinzidenzkorrektur ICSH, empfohlene Methode (1988B)* DIN 58934-1 (1997)	Frischblut, Surrogatmaterial: Fixierte Thrombozyten
Differentialblut-bild	Visuelle Differenzierung von 4 x 200 Zellen, NCCLS H20-A (1992)	Frischblut Vergleich mit Ausstrich

Fortsetzung Tab. 02:

Retikulozyten-konzentration	Elektronische Impulszählung nach Anfärbung der RNS bzw. DNS-Reste ICSH, empfohlene Methode (1992) oder NCCLS H44-P (1993B) Pure and Appl. Chem., 3, 1141 (1991)	Frischblut, Surrogatmaterial: mit Ethylenglykol fixierte Erythrozyten/Retikulozyten

(DIN 58933-1, 1995; DIN 58932-2, 1998; DIN 58932-1, 1996; DIN 58934-1, 1997; DIN 58931, 1995; DIN 58932-3, 1994)

Vor Inbetriebnahme des Gerätes muß eine Erst-kalibration durch den Hersteller erfolgen, die entweder mit Frischblutproben von gesunden Normalpersonen oder mit unterschiedlichen Frischblutproben durchgeführt wird. Eine Nach-kalibration durch Nichttechniker mit stabilem Kalibriermaterial darf nur nach Absprache mit dem Hersteller durchgeführt werden.

Für die **Prüfphase II** wird von den Autoren eine Empfehlung zur Probengewinnung und Behandlung bzw. Lagerung gegeben. Danach sollen die mit K_3EDTA ungerinnbar gemachten Blutproben bei 18-22 °C nicht länger als 4 Stunden bis zur Verarbeitung gelagert werden. Bei der Verwendung von Na-Citrat, Li-Heparin oder andere Antikoagulanzien, muß deren Einfluß auf das Blut beachtet und im Protokoll vermerkt werden. Die Durchmischung der korrekt befüllten Proberöhrchen vor der Messung hat durch einen Überkopf- oder Schaukelmischer zu erfolgen. Die Temperatur von Reagenzien und Raumluft sollte 20-24 °C betragen und über die gesamte Evaluation protokolliert werden, um eventuelle Einflüsse auf Gerät und Ergebnisse zu erkennen. Die Probenzuführung und Behandlung im Gerät muß mit allen Verdünnungsstufen beschrieben werden.

Des weiteren soll in Phase II der Einfluß der Probenalterung und Probenstabilität auf die Meßergebnisse in einer Studie bestimmt und die Stabilität für jeden

Parameter angeben werden. Die Grenze der klinisch tolerierbaren Abweichungen ist erreicht, wenn 3 Standardabweichungen der Präzision in der Serie überschritten werden. Für das Differentialblutbild sind die Ergebnisse nicht mehr tolerabel, wenn 99 % der Vertrauensgrenze der Poissonverteilung überschritten werden. Dazu müssen Blutproben von gesunden und kranken Spendern bei verschiedenen Temperaturen gelagert und zu den Zeitpunkten ½, 1, 1½, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 und 72 Stunden nach der Blutentnahme gemessen werden.

Vom Hersteller wird verlangt, in Phase II Angaben über Referenzbereiche, Meßbereiche und Nachweisgrenzen zu machen. Dabei sollen die Referenzbereiche nach Altersgruppen und Geschlecht unterschieden werden und auf Besonderheiten des Patientengutes, bedingt durch Einflüsse von Region, Rasse und geographischer Höhe, hingewiesen werden. Die Angaben des Herstellers über die Meßbereiche von allen im Blut vorkommenden Zellarten und Zellkomponenten sind auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Die Gesellschaft für klinische Chemie erachtet die in Tabelle 03 angegebenen Meßbereiche als klinisch sinnvoll.

Tab. 03: Empfehlung für die Meßbereiche des roten Blutbildes, der Thrombozyten und Retikulozyten durch die Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie

Parameter	Spannweite	Bemerkungen
Hämoglobin-bestimmung	1,25 – 15,6 mmol/l	
Erythrozyten-zählung	0,75 – 7,5 T /l	
Hämatokrit-bestimmung	0,10 – 0,80 l/l	
Mittleres Erythrozyten Volumen (MCV)	55 – 130 fl	
Erythrozytenver-teilungsbreite (RDW)	–	abhängig vom Meßprinzip
Retikulozytenzahl	10 – 500 G/l	
Thrombozytenzahl (PLT)	1 – 1500 G/l	In der Humanmedizin wird 5 G/l als Transfusionsindika-tion angenommen
Mittleres Thrombozyten Volumen (MPV)	5,5 – 12,5 fl	abhängig vom Meßprinzip
Thrombozyten Verteilungsbreite (PDW)	–	abhängig vom Meßprinzip

Tab. 04: Empfehlung für die Meßbereiche des weißen Blutbildes durch die Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie

Parameter	Spannweite	Bemerkungen
Absolute Leukozytenzahl	0,001 – 99,0 G/l	In der humanmedizinischen Transfusionsmedizin wird bei einer Leukozytenkonzentration von 10^6 pro Transfusion (bei einer üblichen Transfusionsmenge von 300 ml) mit einer Alloimmunisierung gerechnet.
Neutrophile Granulozyten	0,05 – 99,0 G/l	
Eosinophile Granulozyten	0,05 – 20,0 G/l	
Basophile Granulozyten	0,05 – 1,0 G/l	
Monozyten	0,05 – 20,0 G/l	
Lymphozyten	0,05 – 99,0 G/l	

Die Überprüfung der Nachweisgrenzen für die vom Hersteller angegebenen Parameter erfolgt durch eine Konzentration bzw. Verdünnung der Blutbestandteile. Der Einfluß der übrigen Zellarten und Zellkomponenten auf die Ergebnisse muß im normalen, niedrigen und hohen Bereich untersucht werden.

Als letzter Schritt in Phase II wird vorgegeben, die Erkennung von pathologischen Zellen und die Anfälligkeit für Interferenzen sowie die Korrektur dieser Störungen zu untersuchen.
Interferenzen können durch methodenbedingte Störungen auftreten. So kann ein z.B. angeborener Peroxydasemangel beim Menschen, zu Fehlern führen, wenn mit

Systemen gearbeitet wird, die sich einer Anfärbung der zellulären Peroxidase bedienen. Weitere Beispiele hierfür sind die Zerstörung fragiler Zellen durch beim oder vor dem Meßvorgang auftretende Scherkräfte, Verfälschung der Ergebnisse durch Koinzidenzverluste bei hohen Zellzahlen und zu groß dimensionierter Meßöffnung und Zählfehler bei Widerstandsmeßgeräten durch Verfälschung der Signale beim Durchtritt der Zelle durch die Meßöffnung am Rand oder in der Mitte bzw. durch Rezirkulation bedingte Doppelzählung der Partikel.

In **Prüfphase III** wird die Untersuchung von Präzision, analytischem Drift, Verschleppung, Richtigkeit und Linearität des Analysators durch die Autoren empfohlen.
Die Überwachung der Präzision innerhalb der Serie erfolgt durch 20-fache Messung einer Patientenblutprobe und von Kontrollmaterialien mit hohen, niedrigen und normalen Zellkonzentrationen. Von den Ergebnissen werden jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet. Bei der Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag werden Kontrollmaterialien an zehn Arbeitstagen oder bis zum Verfallsdatum der Kontrollen täglich gemessen (Doppelbestimmungen). Für die Meßbereiche hoch, niedrig und normal sollen Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient dargestellt werden. Ergänzend dazu muß das Gerät an einem Tag mehrfach kalibriert und jeweils die Präzision innerhalb der Serie an Frischblutproben bestimmt werden.
Beim analytischem Drift wird Frischblut, partiell stabilisiertes Blut oder Surrogatmaterial in unterschiedlichen Zeitintervallen untersucht und mittels t-Test ein Vergleich der Mittelwerte auf Abweichung durchgeführt. Alternativ kann mit Parametern, die eine hohe interindividuelle Konstanz besitzen (MCHC, MCV, MCH), der analytische Drift statistisch über einen längeren Zeitraum überwacht werden.

Der Test auf Verschleppung stellt sicher, daß Ergebnisse durch die aufeinanderfolgende Messung von Proben mit hohen und niedrigen Zellkonzentrationen nicht verfälscht werden, wobei bedacht werden muß, daß die Zellart Einfluß auf die Größenordnung der Verschleppung hat. Dazu werden zehnmal jeweils nach drei Proben mit hoher (H1, H2, H3) drei Proben mit niedriger (N1, N2, N3) Konzentration gemessen. Aus der Differenz zwischen N1 und N3 wird mittels gepaartem t-Test errechnet, ob eine signifikante Verschleppung vorliegt. Die

Berechnung der durchschnittlichen Verschleppung erfolgt aus dem Mittelwert der N1 und N3 Messungen nach der Formel:

$$\overline{\mathbf{V}} = \overline{\mathbf{N1}} - \overline{\mathbf{N3}}$$

Die prozentuale Verschleppung kann von N3 (ECCLS) oder H3-N3 (ICSH) mit der folgenden Formel angegeben werden:

$$\mathbf{V\%} = \frac{(\mathbf{N1} - \mathbf{N3}) \times \mathbf{100}}{\mathbf{N3} \quad \mathbf{oder} \quad (\mathbf{H3} - \mathbf{N3})}$$

Die Richtigkeit der Meßergebnisse wird durch den Vergleich mit der für den jeweiligen Parameter aktuell gültigen Referenzmethode überwacht (siehe Tabelle 2). Der Vergleich soll an je 20 Proben mit normalen, hoch pathologischen und tief pathologischen Werten erfolgen und mit dem gepaarten t-Test statistisch ausgewertet werden. Das Setzen von Warnsignalen durch das Gerät bei pathologisch veränderten Blutproben (Blasten, LUC, Aggregate, Linksverschiebung) soll auf Sensitivität und Spezifität überprüft werden.
Die Überprüfung der Linearität über den gesamten vom Hersteller angegebenen Meßbereich soll an allen Parametern (Hämoglobingehalt, Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl), die durch Verdünnung bzw. Konzentration beeinflußt werden, erfolgen. Unter Verwendung geeichter Meßinstrumente werden zehn Verdünnungsstufen für den jeweiligen Parameter angefertigt. Meßgrößen, die keiner Veränderung durch eine Verdünnung unterliegen, wie z.B. Thrombozyten- und Erythrozytenindizes, dürfen keine bedeutenden Abweichungen zeigen.
Der am Ende der Evaluation anzufertigende Abschlußbericht enthält die Ergebnisse der statistischen Auswertung (Erläuterungen in den dazugehörigen Anhängen) und die Beurteilung der Handhabung des Gerätes und der Software. Des weiteren sollen die Kosten für Verbrauchsmaterial aufgeführt und eine Empfehlung über den klinischen Einsatz bei der Erstellung von Diagnosen und Überwachung von Therapien gegeben werden.

2.5 Referenzbereiche hämatologischer Parameter beim Rind

Die Untersuchung von Blutbildern gibt dem Untersucher wertvolle Hinweise zur Diagnostik von Krankheiten. So zeigen sich bei vielen Rinderkrankheiten

pathognostische Veränderungen der Blutkörperchen in ihrer Zahl und/ oder in ihren morphologischen Eigenschaften (STÖBER u. GRÜNDER, 1990).

Die Ergebnisse einer klinischen Untersuchung von Patienten werden mit einem Referenzbereich von klinisch gesunden Individuen verglichen.
Ein Referenzbereich wird von einer definierten Probandengruppe abgeleitet. Eine Geltung für alle Individuen einer Rasse oder Art ist damit nicht Verbunden (KRAFT u. DÜRR, 1995).
Der Referenzbereich liegt zwischen zwei Referenzgrenzen. Diese Referenzgrenzen leiten sich aus einer mit adäquaten statistischen Methoden ermittelten hypothetischen Verteilung der Referenzwerte ab (IFCC, 1983b). Bei der Erstellung von Referenzwerten müssen Kriterien für die Referenzindividuen und die Probenaufarbeitung definiert werden (IFCC u. ISCH, 1987). Der IFCC hat dazu folgende sechs Punkte aufgestellt:

1. Ein- und Ausschlußkriterien der Referenzpopulation
2. Eigenschaften der Referenzpopulation wie Alter und Geschlecht der Individuen
3. Umweltbedingungen der Referenzpopulation und Entnahmebedingungen
4. Behandlung der Individuen bei Probeentnahme und der gewonnenen Proben
5. Genaue Spezifikation der verwendeten Analysemethoden
6. Verwendete statistische Methoden

Die klassische statistische Methode zur Herstellung von Referenzbereichen ist die Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes mit zweifacher Standardabweichung ($\bar{x} \pm 2s$). Diese Methode setzt voraus, das die Daten einer Gauß'schen Normalverteilung unterliegen. Dieses trifft in der Medizin für die wenigsten Parameter zu. Daher soll für den Fall einer schiefen Verteilung die Berechnung von nicht-parametrischen Normbereichen eingesetzt werden. Parametrische Normbereiche sollten für normalverteilte Merkmale Anwendung finden. (GROSS u. WICHMANN, 1979; IFCC, 1983a; ACKERMANN, 1983)

2.5.1 Rotes Blutbild und Retikulozyten

Die Bildung der roten Blutkörperchen findet ab der zweiten Hälfte der Embryonalentwicklung im Knochenmark statt. Eine Unterscheidung der kernhaltigen Zellen der Erythropoese kann aufgrund ihrer Größe, des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses, der Kernstruktur und der Anfärbbarkeit des Zytoplasmas gemacht werden. In Tab. 5 sind die Eigenschaften der einzelnen Entwicklungsstufen der Erythropoese dargestellt (LÖSCH et al., 2000).

Tab. 05: Charakteristika der Zellformen während der Erythropoese bei Säugetieren

Zellformen	Charakteristika
Proerythroblast	Junge, unreife, große, runde Zelle; kernhaltig, scharf begrenzte Nukleolen; Zytoplasma stark basophil
Erythroblast	Kleinere, runde Zelle; keine Nukleolen; kleinerer Kern; Zytoplasma von basophil bis polychromatisch; zunehmender Hämoglobingehalt
Normoblast	Zelle wird noch kleiner; dichterer Kern; vollständige Hämoglobinisation; Zytoplasma polychromatisch bis ortho-chromatisch
Retikulozyt	Kernlos; feines netzartiges Gerüst (Ausfälllung von Ribonukleoproteinen bei der Retikulozytenfärbung); nicht mehr teilungsfähig; noch mäßige RNA-, Protein- und Hämsynthese
Normozyt (reifer Erythrozyt)	Kleine, kernlose, runde Zelle mit zentraler Aufhellung (bikonkave Form)

Normoblasten und Retikulozyten, als erythrozytäre Vorläuferzellen, sind im Blut sehr selten anzutreffen. Die Entwicklung und Reifung läuft vollständig im Knochenmark ab. Ihre Lebensdauer im Blut beträgt ca. 160 Tage. Mit einem Durchmesser von 5,7 µm besitzen Rinder im Vergleich zu den anderen Haustierarten relativ große

Erythrozyten (EDER, 1987). Durch eine physiologische Anisozytose schwankt der Querdurchmesser zwischen 4 und 9 µm (JAIN, 1993).

Die Erfassung der Erythrozytenzahl (RBC, Red Blood Count) ist eine Basisuntersuchung zur Bestimmung von Störungen der Erythropoese. Die Erythrozyten sind charakterisiert durch die Hämoglobinkonzentration HGB, das mittlere Zellvolumen (MCV, Mean Corpuskular Volume) und der Erythrozytenverteilungsbreite (RDW, Red cell Distribution Width). Der Hämatokritwert HCT und die Erythrozytenindizes (MCV, Mean Corpuscular Volume), (MCH, Mean Corpuscular Hemoglobin), (MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) werden je nach verwendetem Hämatologiesystem berechnet oder direkt gemessen (SCHALM et al., 1975).

Der RBC dient zusammen mit dem Hämatokritwert der Erkennung von Anämien oder Hämokonzentrationen. Nach ihrer Entstehung muß man hämorrhagische (durch Blutverlust), hämolytische (aufgrund intravasaler Auflösung von Erythrozyten) und nichtregenerative Anämien (gestörte Neubildung im Knochenmark) unterscheiden. Eine leichte Anämie liegt vor, wenn die Erythrozytenzahl 3,5 - 5 T/l Blut beträgt. Bei einer mäßigen Anämie beträgt der Wert 2,5-3,5 T/l, sinkt der Wert unter 2,5 T/l Blut, spricht man von einer schweren Anämie und bei Erythrozytenzahlen unter 1,5 T/l Blut ist die Prognose ungünstig (STÖBER u. GRÜNDER, 1990).

Das MCV dient der Einteilung der Erythrozyten in normo-, mikro- und makrozytär. Nimmt der Anteil mikrozytärer oder makrozytärer Erythrozyten zu, spiegelt sich dies in einer größeren Erythrozytenverteilungsbreite wider, und man spricht von einer Anisozytose. Eine ausgeglichene Zunahme von Mikrozyten und Makrozyten führt ebenfalls zu einem Anstieg der RDW, dabei bleibt aber das MCV scheinbar unverändert.
Eine Mikrozytose tritt bei Eisen- Kupfer- und Vitamin-B_6-Mangel auf. Bei Eisenmangel werden mehr Zellteilungen durchgeführt, infolge dessen nimmt das Volumen der Erythrozyten ab und die Verteilungsbreite zu (THOMAS, 1998).
Eine Makrozytose ist ein Hinweis auf eine regenerative Anämie, in deren Verlauf der Anteil großer Erythrozyten immer weiter zunimmt. Weiter kommt Vitamin-B_{12}-Mangel in Betracht. Bei der Makrozytose ist die DNS-Synthese verringert mit der Folge, daß die Erythropoese mit weniger Zellteilungen abläuft (THOMAS, 1998).

Die Bestimmung des mittleren Hämoglobingehaltes der Erythrozyten (MCH) wird nach folgender Formel berechnet:

$$MCH = (Hb \div RBC) \times 10$$

Der MCH dient der Differenzierung von normochromen, hypochromen und hyperchromen Anämien. MCV und MCH sind eng korreliert. Ist das Volumen verringert, liegt auch eine Hypochromasie vor. Normozytäre Anämien entsprechen demzufolge normochromen Anämien. Makrozytäre Anämien bedingen nicht immer einen Anstieg des MCH (THOMAS, 1998).

Die mittlere Hämoglobinkonzentration (MCHC) der zirkulierenden Erythrozytenmasse wird berechnet nach der Formel:

$$MCHC = Hb \times 100 \div HCT$$

Durch die Verwendung von HCT und HGB bei der Berechnung des MCHC ist dieser Wert leicht und präzise zu ermitteln, und ein guter Indikator von Eisenmangelanämien (EDER, 1987).

Ein Anstieg der MCHC wird nur beim Erscheinen von Sphärozyten im Blut, wie es bei immunvermittelter Anämie oder bei einer frischen invitro oder vivo Hämolyse vorkommt, beobachtet. Werte unter dem Normbereich können bei hypochromen bzw. regenerativen Anämien auftreten (GOLDSTON et al., 1980).

Der CHCM entspricht dem MCHC, wird aber aufgrund der direkten Erfassung beim Messvorgang nicht durch eine frische Hämolyse verfälscht. Der Vergleich von MCHC und CHCM gibt bei Differenzen dieser beiden Parameter einen Hinweis auf eine akute Hämolyse.

SCHLERKA u. BAUMGARTNER (1983) sowie WEISS u. PERMAN (1992) halten MCV, MCH und MCHC beim Rind für unbrauchbar, da nach Ansicht der genannten Autoren aufgrund der natürliche Anisozytose keine brauchbaren Referenzbereiche definiert werden können.

Der Hämatokritwert (HCT) ist abhängig von Zahl und Volumen der Erythrozyten und dem Plasmavolumen. Dabei ist zu beachten, daß der Hämatokritwert einen Relativwert darstellt, der das Verhältnis von Blutkörperchen zu Plasma wiedergibt.

Sofern nicht eine Messung mittels Zentrifugation erfolgt, kann der HCT nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$HCT = RBC \times MCV \div 10$$

Die Bestimmung des Hämoglobins im Blut ist bei der Klärung von Anämienursachen, bei der Beurteilung des Verlaufs und bei der Therapie von Bedeutung (THOMAS, 1998).

Der Anteil der Retikulozyten auf 1000 gezählte Erythrozyten gibt bei einer Anämie Auskunft über die Aktivität des Knochenmarks und die Regenerationsfähigkeit der Erythrozyten. Adulte, über zwei Jahre alte gesunde Rinder weisen im peripheren Blut keine Retikulozyten auf. Bei jüngeren Tieren sind sporadisch Retikulozyten anzutreffen; bei unter zwei Tage alten Kälbern bis zu 10 ‰. Die diagnostische und prognostische Aussagekraft der Retikulozytenzählung ist aufgrund der großen Variabilität der Ergebnisse gering (STÖBER u. GRÜNDER, 1990).

Tab. 06: Erythrozyten- und Retikulozyten-Werte aus der Literatur

Parameter und Einheit	Autoren und Erscheinungsjahr der Veröffentlichung			
	Stöber u. Gründer (1990)		**Kraft u. Dürr (1997)**	**Schalm (1977)**
	Kälber	Rinder	Rinder	Rinder
RBC T/l	5,0-10,0	5,0-8,0	5,0 – 10,0	5,0 – 10,0
HCT l/l	0,30 – 0,40		0,28 – 0,38	0,24 – 0,46
HGB mmol/l	4,9 – 8,7 *	4,9 – 7,5*	5,6 – 8,7	4,9 – 9,3 *
MCV fl	40,0 – 60,0 *		46 - 65	40 – 60
MCH fmol	0,87 – 1,49 *		0,7 – 1,0	0,68 – 1,06 *
MCHC mmol/l, %	26 % – 34 %		19 - 21	30 % – 36 %
Retikulozyten ‰	0,0 - 10	0,0	0,0	0,0

*Werte in SI Einheiten umgerechnet

KLEE et al. (1979) untersuchten die prognostische und diagnostische Information von Blutharnstoff und Hämatokritwert bei Kälberdiarrhoe. Die Heilungsaussicht verschlechtert sich signifikant bei einem HCT über 0,5 l/l und Harnstoffwerten über 28,45 mmol/l. Nach WATT (1967) besteht schon ab einem Hämatokritwert von 0,55 l/l eine schlechte Prognose, und nach MANOIU (1973) schon ab einem Wert über 0,45 l/l.

DOLL (1991) beschreibt Hämokonzentrationen bei Kälbern mit Werten zwischen 0,40 und 0,50 l/l bei Störungen der Mikrozirkulation von Darmabschnitten, bei Darmscheibendrehung oder Volvulus jejuni. Weitere Ursachen können auch Labmagentorsionen und Inkarzerationen der Pars pylorica des Labmagens oder des Duodenums sein. Dabei ist der Verlust von Flüssigkeit, die ins Darmlumen sezerniert wird, für den Anstieg des HCT verantwortlich.

HOFMANN (1972) weist auf den Zusammenhang zwischen der Verabreichung furozolidonhaltiger Präparate und hämorrhagischer Diathese bei Kälbern hin. Die Tiere entwickeln eine Panzytopenie mit mäßiger Anämie, ausgeprägter Agranulozytose und Thrombozytopenie. Hayashi (1976) berichtet in diesem Zusammenhang von 4 Kälbern, die aufgrund der Panmyelophiphtise und der hämorrhagischen Diathese Erythrozytenwerte von 3,3 – 5,4 T/l, Hämatokritwerte zwischen 0,12 – 0,26 l/l und einen Hämoglobingehalt von 2,2 bis 4,2 mmol/l aufwiesen.

OGAWA et al. (1989) beschreibt bei zwei Kühen post partum eine hämolytische Anämie mit Mikrozytose, induziert durch eine Phosphormangel-Fütterung. Der Phosphormangel im Blutplasma beeinflußte die Funktion und Widerstandsfähigkeit der Erythrozyten durch Einschränkung der ATP-Produktion.

ANOSA et al. (1992) berichtet von elf Kälbern, die im Verlauf einer Trypanosoma vivax-Infektion eine Anämie, Thrombozytopenie und initiale Leukopenie entwickelten. Im weiteren Krankheitsgeschehen zeigte sich eine Leukozytose mit Lymphozytose und Neutropenie und einer moderaten Retikulozytose mit 3,6 - 9,4 %.

Eine hochgradige Anämie durch den Befall mit Linognatus vituli wird von GRÜNDER (1980) beschrieben. Die betroffenen Kälber hatten einen Hämatokritwert von 0,11 l/l, bei 2 T/l Erythrozyten und einem Hämoglobingehalt von 1,8 mmol/l. Zusätzlich zeigte das weiße Blutbild eine Leukozytose von 30 G/l mit leichter Kernlinksverschiebung (5 %) und ausgeprägter Neutrophilie (87 %).

2.5.2 Weißes Blutbild

Zum weißen Blutbild wird die Gesamtleukozytenzahl (WBC) und das Differentialblutbild mit der absoluten Anzahl und dem prozentualem Anteil der einzelnen Zellpopulationen gezählt. Unter dem Oberbegriff „Leukozyten” werden unterschiedliche Zellpopulationen zusammengefaßt. Morphologisch werden mononukleäre Zellen (**MN**; Monozyten und Lymphozyten) und polymorphnukleäre Zellen (**PMN**; neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten) unterschieden (EDER, 1987).
Sinkt der WBC unter 5 G/l Leukozyten, wird beim Rind von einer Leukozytopenie gesprochen. Dies deutet auf eine akute Belastung des Organismus durch Intoxikation oder ein Infektionsgeschehen hin. Dieser Zustand bleibt meist nur wenige Stunden bis Tage bestehen, um dann in eine Leukozytose überzugehen. Geschieht dies nicht, ist die Prognose ungünstig.
Eine kurzzeitige Leukozytose tritt beim Rind unter Umständen schon nach schwerer körperlicher Anstrengung bzw. Stress auf. Eine länger andauernde Erhöhung des WBC weist auf eine akute bakterielle oder virale Lokal- oder Allgemeininfektion hin. Bei Bakteriämien lassen sich ausgeprägte Veränderungen feststellen, allerdings kann bei chronisch abzedierten Pneumonien und jauchigen Peritonitiden ein Anstieg der Gesamtleukozytenzahl fehlen. Eine Erhöhung des WBC auf 20-30 x G/l wird beim Rind sehr selten beobachtet (STÖBER u. GRÜNDER, 1990; SCHALM, 1999).

Das Differentialblutbild wird beim Rind von den Lymphozyten geprägt "Lymphatisches Blutbild"; der prozentuale Anteil der Lymphozyten beträgt beim Neugeborenen 50 % und steigt bis zum fünften Lebensjahr kontinuierlich an, wobei die absolute Lymphozytenzahl sich stetig verringert (KRAFT et al., 1997).
Im Alter von 2-3 Monaten verringert sich der Anteil der neutrophilen Granulozyten auf 25 % und die Lymphozytenanteil steigt auf 60 %. Mit einem Jahr erreicht der Lymphozytenanteil 70 % der Leukozyten. Das Verhältnis von Lymphozyten zu neutrophilen Granulozyten sollte beim gesunden Rind 2:1 betragen. Alle übrigen Zellpopulationen der Leukozyten unterliegen in ihrer Anzahl keiner oder nur geringer Altersabhängigkeit (SCHALM, 1999).
In Tabelle 7 sind die Normalwerte für das Differentialblutbild der Spezies Rind von verschiedenen Autoren vergleichend dargestellt.

Tab. 07: Referenzbereiche des weißen Blutbildes nach Literaturangaben

Parameter und Einheit	Autoren und Erscheinungsjahr der Veröffentlichung			
	Stöber u. Gründer (1990)		Kraft u. Dürr (1997)	Schalm (1977)
	Kälber	adulte Rinder	Adulte Rinder	adulte Rinder
WBC G/l	5,0 – 12,0	5,0 - 10,	4,0 – 10,0	4,0 – 12,0
Lymphozyten G/l	4,0 – 10,0	2,5 – 5,5	2,5 – 5,5	2,5 – 7,5
%	45 – 65		45 – 65	45 – 75
Monozyten G/l	—		0 – 0,33	25 – 840
%	2 – 8		2 - 6	2 - 7
Stabkernige neutrophile Granulozyten G/l	—		0 – 0,2	0 – 0,12
%	0 – 3		0 - 3	0 – 2
Segmentkernige neutrophile Granulozyten G/l	—		1 – 3,5	0,6 - 4
%	25 – 45		25 – 45	15 – 45
eosinophile Granulozyten G/l	3,0 – 9,0		0,3 – 1,5	0 – 2,4
%	1 – 10		1 - 10	2 – 20

Fortsetzung Tab. 07:

Parameter und Einheit	Autoren und Erscheinungsjahr der Veröffentlichung			
	Stöber u. Gründer (1990)		Kraft u. Dürr (1997)	Schalm (1977)
	Kälber	adulte Rinder	adulte. Rinder	adulte Rinder
basophile Granulozyten G/l	—		0 – 0,1	0 – 0,2
%	0 – 2		0 - 2	0 - 2

Die Aussagekraft des weißen Blutbildes beruht beim Rind hauptsächlich in den Veränderungen des Differentialblutbildes, da die Gesamtleukozytenzahl bei vielen Krankheiten keine relevanten Veränderungen zeigt. Der mit einer Krankheit verbundene Streß löst eine Ausschüttung von Kortisol aus. Folge ist ein Streßblutbild mit einer Verringerung in der Zahl der Monozyten, Lymphozyten sowie der eosinophilen und basophilen Granulozyten; dagegen steigt die Zahl der neutrophilen Granulozyten an. Das Knochenmark schüttet reife neutrophile Granulozyten ins Blut aus, die umgehend in das betroffene Gewebe übertreten. Das Verhältnis von Lymphozyten zu neutrophilen Granulozyten verschiebt sich von 2:1 bis zu einem Verhältnis 1:3. Durch den begrenzten Vorrat reifer neutrophiler Granulozyten kommt es zu einer Freisetzung von stabkernigen neutrophilen Granulozyten ins Blut (Linksverschiebung). Im Knochenmark proliferieren die granulozytären Vorläuferzellen, und nach 4-5 Tagen erscheint die Leukozytenzahl normal bis erhöht (COLE et al. 1997).

Experimentell wurde bei Rindern eine milde vorübergehende Neutropenie durch subkutane Injektion des Endotoxins von Pseudomonas aeruginosa hervorgerufen. Durch intravenöse Injektion wurde eine länger andauernde Neutropenie ausgelöst (LUMSDEN et al., 1974).

2.5.3 Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose Zellabschnürungen der im Knochenmark ansässigen Megakaryozyten. Mit einem Durchmesser von 2–3,5 µm sind sie die kleinste Zellgruppe des Blutes und haben eine rundliche bis spindelförmige Gestalt. Tritt durch eine Gefäßverletzungen Blut aus, bilden sie tentakelähnliche Protoplasmaausläufer und neigen zu Zerfall und Agglutination. Sie sind somit ein wichtiger Bestandteil der Blutgerinnung (EDER, 1987).
Das Rind verfügt über 300–800 G/l Thrombozyten im zirkulierenden Blut. Thrombozytosen treten nach Operationen, Blutverlusten und Splenektomien auf. Thrombozytopenien können bei disseminierter intravasaler Gerinnung auftreten und bei Depression des Knochenmarks durch Medikamente oder ionisierende Strahlung ausgelöst werden (KRAFT et al., 1997).
Thrombozytopenien im Zusammenhang mit BVD/MD Infektionen werden u. a. von (CORAPI et al., 1990) beschrieben.
Tabelle 8 auf der folgenden Seite stellt die Referenzbereiche für Thrombozyten nach Angaben verschiedener Autoren gegenüber.

Tab. 08: Thrombozytennormalwerte aus der Literatur

Parameter und Einheit	**Autoren und Erscheinungsjahr der Veröffentlichung**			
	Stöber u. Gründer (1990)		**Kraft u. Dürr (1997)**	**Schalm (1977)**
	Kälber	adulte Rinder	adulte Rinder	adulte Rinder
Thrombozyten G/l	200 – 800		300 - 800	100 - 800

2.5.4 Vergleichsuntersuchungen ADVIA 120

MORITZ (2000) und DUFFIELD et al. (2000) erstellten mit Hilfe des ADVIA 120 vom Alter unabhängige Referenzbereiche für das Rind. In der folgenden Tabelle 9 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 09: Referenzbereiche erstellt am ADVIA 120

Parameter und Einheit	**DUFFIELD (2000)**	**MORITZ (2000)**
WBC G/l	5,05-13,30	5,6 – 14,3
RBC T/l	4,90 – 7,50	5,37 – 10,63
HGB mmol/l	5,21 – 7,44	4,73 – 8,95
HCT l/l	0,21 – 0,30	0,21 – 0,37
MCV fl	36 - 50	28,28 – 50,69
MCH fmol	0,87 – 1,18	0,65 – 1,17
MCHC mmol/l	23,59 – 26,75	21,03 – 27,31
CHCM mmol/l	k. a.	20,30 – 25,15
RDW %	16 – 20	16,63 – 26,73
HDW mmol/l	k. a.	1,06 - 1,88
Retikulozyten G/l	0,00	1,89 – 95,59

Fortsetzung Tab. 09:

Parameter und Einheit	DUFFIELD (2000)	MORITZ (2000)
PLT G/l	160 – 650	154 - 1022
MPV fl	4,60 – 7,40	5,10 – 9,70
MPC g/l	k. a.	159,70 – 246,80
MPM pg	k. a.	1,00 – 1,60
PDW %	k. a.	46,60 – 81,30
PCDW g/l	k. a.	55,90 – 76,10
PMDW pg	k. a.	0,40 – 0,90
neutr. Gran. G/l*	1,70 – 6,20	1,19 – 6,40
Lymphoz. G/l*	1,80 – 8,10	2,72 – 8,75
Monozyten G/l*	0,10 – 0,70	0,18 – 0,88
eos. Gran. G/l*	0,05 – 1,15	0,04 – 1,52
baso. Gran. G/l*	0,00 – 0,20	0,03 – 0,23

* manuelles und automatisches Blutbild

2.5.5 Rassespezifische Referenzbereiche

Der Einfluß der Rasse auf die hämatologischen Blutwerte und ihre Bedeutung für die Auswertung von Blutuntersuchungen wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich bewertet.
Statistisch signifikante Rasseunterschiede sind nicht so bedeutend, als daß sie bei

der Beurteilung von Blutbildern eine klinische Relevanz aufweisen würden. JAIN (1986) sowie STÄMPFLI u. ITTIG (1982) vergleichen 600 Jungstiere im Alter zwischen 3 und 13 Monaten der Rassen Braunvieh, Simmentalerfleckvieh und Schwarzfleckvieh, eingeteilt nach dem Blutanteil an Red Holstein und Brown Swiss. Für Hämatokritwert, Hämoglobin, Erythrozytenzahl, MCV, MCHC, Leukozytenzahl und dem prozentualem Anteil der eosinophilen Granulozyten, der Lymphozyten und der Monozyten werden signifikante Unterschiede zwischen wenigstens 2 der 9 Tiergruppen festgestellt. Demnach weisen die Original Simmentalerfleckviehstiere einen im Gegensatz zu den Tieren mit Red Holsteinblut niedrigeren Hämatokritwert auf. Mit der Einkreuzung steigt der Hämatokritwert, die Erythrozytenzahl und der Hämoglobingehalt tendenziell an.

Die Einkreuzung von Braun Swiss in Braunvieh führt zu einer Abnahme von Hämoglobin und Hämatokritwert. Die Erythrozytenzahl sinkt mit steigendem Fremdblutanteil. Braunviehstiere mit Braun Swiss-Blut zeigten höhere MCH Werte gegenüber den verglichenen Rassen (MAMMERICKX et al. 1978)

Bei der Leukozytenzahl weisen alle Braunviehstiere niedrigere Werte auf als die übrigen Rassen. Schwarzfleckvieh und Simmentalerfleckvieh mit hohem Red Holstein-Anteil weisen die höchsten Leukozytenwerte auf.

AMAKIRI ET AL. (1979) stellen bei einem Vergleich der Rassen German Brown und N`Dama fest, daß Erythrozyten- und Leukozytenzahl sowie der Hämatokritwert bei N`Dama signifikant erhöht sind. Rinder aus Kreuzungen beider Rassen weisen dem Blutanteil entsprechend intermediäre Werte auf.

Im Vergleich mit anderen Rassen weisen Rinder der Rassen Jersey (MAMMERICKX, 1978) und Guernsey (RYAN, 1971a) niedrigere Erythrozyten- und Leukozytenzahlen auf. GREATOREX (1975) führt die Unterschiede bei diesen Rassen auf die Haltung auf einer Insel zurück. Brown Swiss-Rinder haben geringere Erythrozytenzahlen und Charolais-Rinder erhöhte Erythrozytenzahlen sowie höhere Hämatokritwert– und Hämoglobinwerte. STEINHARD et al. (1994) beschreiben signifikante Unterschiede der mittleren HGB-Konzentration bei Milchkühen unmittelbar post partum.

Die Leukozytenzahl, der Anteil der Monozyten und neutrophilen Granulozyten ist bei Herefordrindern und Charolais erhöht, dagegen bei Rindern der Rasse Jersey erniedrigt (RYAN, 1971b).

MENESES (1980) beobachtet höhere Leukozytenzahlen und Lymphozytenwerte bei Jersey- als bei HF-Rindern. BUSCH (1965) hält Variationen der Blutwerte für

physiologische Schwankungen und führt die von ihm und von anderen Autoren festgestellten Differenzen auf Unterschiede in den Untersuchungszeitpunkten, in den Umweltbedingungen und den unterschiedlichen Rassezugehörigkeiten zurück. In Untersuchungen von KRAFT (1967) und TENNANT et al. (1974) werden keine signifikanten Rasseunterschiede festgestellt. DOORNENBAL (1977) untersucht Hämoglobinkonzentration und Hämatokritwert bei Rindern der Rassen Short–Horn, Charolais, Simmentaler, Limousin, Red Angus, Beefmaster, Brown Swiss , Chianina und Jersey und findet signifikante Unterschiede für alle Rassen.

2.5.6 Geschlechtsspezifische Referenzbereiche

Unterschiede im Blutbild, die durch das Geschlecht bedingt sind, werden hinsichtlich der Erythrozytenzahl in mehreren Untersuchungen beschrieben. STÖBER u. GRÜNDER (1990) stellen fest, daß "geschlechtsreife Jungbullen normalerweise etwas höhere Erythrozytenwerte aufweisen als gleichaltrige weibliche Rinder". SCARBOROUGH (1932) beschreibt für Bullen 1 bis 1,5 T/l höhere Erythrozytenzahlen als für Kühe. DOORNENBAL (1977) stellt bei weiblichen Rindern höhere Hämatokritwerte fest als bei Bullen. Im Gegensatz dazu ist die Hämoglobinkonzentration bei Färsen niedriger als bei den männlichen Tieren. Dagegen können HOLMAN u. DEW (1967) keine Geschlechtsunterschiede feststellen.

Der Einfluß von Reproduktionsstand und Milchleistung auf das Blutbild weiblicher Rinder ist bekannt. STÖBER u. GRÜNDER (1990) beschreiben ein Absinken der Erythrozytenwerte bei tragenden Tieren. Im Gegensatz dazu beobachtet JAIN (1986) einen leichten Anstieg im Laufe der Trächtigkeit. Einen Rückgang der Erythrozytenzahlen bei hochlaktierenden Milchkühen infolge eines fütterungsbedingten Mangels an Eiweiß, Eisen, Kupfer oder Kobalt wird von STÖBER u. GRÜNDER (1990) in Erwägung gezogen. Eine negative Korrelation von Milchleistung und Parametern des roten Blutbildes (Hämatokritwert, Hämoglobingehalt und Erythrozytenzahl) wird durch andere Arbeiten bestätigt (NOONAN et al., 1978; HEWETT, 1974).

Einen Abfall der Leukozytenzahl infolge einer Abnahme der neutrophilen Granulozyten während der Hochlaktation wird von PAAPE (1974) beschrieben.

Einen Abfall der Zahl der eosinophilen Granulozyten (weniger als 100 Eosinophile /mm^3) beobachten BOSTEDT u. BERCHTOLD (1968) bei Kühen ante und peripartal. Post partum konnte die Autoren eine Eosinophilie mit Mittelwerten > 700 Eosinophile /mm^3 beobachten. Vier Tage nach der Geburt konnten wieder Werte im Normbereich festgestellt werden.

2.5.7 Altersspezifische Referenzbereiche

Die Veränderungen der Blutbilder in Abhängigkeit vom Alter sind in vielen Arbeiten untersucht worden. In den folgenden Tabellen 10 und 11 sind die Referenzbereiche für Jersey- und Holsteinrinder altersabhängig dargestellt.

Tab. 10: Altersabhängige Leukozytenwerte weiblicher Jerseyrinder

		Altersabhängige Leukozytenwerte weiblicher Jerseyrinder Jain (1986)						
Parameter Einheit G/l		1-6 Monate n=16	6-12 Monate n=10	1-2 Jahre n=14	2-3 Jahre n=31	3-4 Jahre n=28	4-6 Jahre n=14	>6 Jahre n=28
WBC	$\bar{x}$	8,75	7,75	9,00	9,40	7,70	7,75	7,70
	s	2,50	1,80	2,50	1,75	1,90	1,10	2,50
Stab. Neutr. G.	$\bar{x}$	0,05	0,00	0,00	0,025	0,00	0,015	0,005
	s	0,075			0,125		0,045	0,030
Segm. Neutr. G.	$\bar{x}$	3,00	0,80	2,35	2,15	1,90	1,80	1,80
	s	1,75	0,45	1,40	0,93	0,95	0,65	0,90
Lymph.	$\bar{x}$	4,65	6,30	5,90	5,30	4,60	4,0	4,25
	s	1,30	1,50	1,60	1,20	1,05	0,85	2,05
Mono.	$\bar{x}$	0,68	0,60	0,42	0,457	0,325	0,45	0,35
	s	0,37	0,17	0,17	0,22	0,150	0,20	0,20
Eosin. G.	$\bar{x}$	0,17	0,08	0,50	1,3	0,90	1,20	1,30
	s	0,52	0,05	0,380	1,00	0,65	0,70	0,70
Baso. G.	$\bar{x}$	0,05	0,00	0,06	0,07	0,05	0,06	0,02
	s	0,06		0,06	0,10	0,05	0,05	0,03

Tab. 11: Altersabhängige Leukozytenwerte weiblicher Holsteinrinder

Parameter/ Einheit G/l		**Altersabhängige Leukozytenwerte weiblicher Holsteinrinder Jain (1986)**				
		1-2 Jahre n=9	2-3 Jahre n=16	3-4 Jahre n=34	4-6 Jahre n=44	>6 Jahre n=17
WBC	$\bar{x}$	11,0	11,40	9,35	8,15	7,90
	s	3,20	2,10	2,00	2,00	1,70
Stab. Neutr. G.	$\bar{x}$	0,00	0,01	0,025	0,030	0,015
	s		0,04	0,020	0,100	0,025
Segm. Neutr. G.	$\bar{x}$	2,26	3,9	3,45	2,80	3,00
	s	0,63	1,35	1,352	1,10	1,25
Lymph.	$\bar{x}$	6,88	5,8	4,90	4,20	3,75
	s	1,250	2,10	1,25	1,50	0,95
Mono.	$\bar{x}$	0,35	0,86	0,30	0,55	0,45
	s	0,10	0,30	0,35	0,30	0,20
Eosin. G.	$\bar{x}$	0,62	0,75	0,63	0,55	0,65
	s	0,40	0,55	0,53	0,35	0,50
Baso. G.	$\bar{x}$	0,30	0,60	0,25	0,35	0,40
	s	0,50	0,70	0,40	0,25	0,30

POMSEL (1980) stellt aus 240 Arbeiten von 1901 bis 1977 die Ergebnisse der Blutzellzählung und Differenzierung zusammen und kommt zu den in Tabelle 12 dargestellten Werten.

Tab. 12: Altersabhängige Referenzbereiche aus Literaturangaben von 1901 bis 1977

Parameter / Einheit		**Altersabhängige Referenzbereiche Zusammenfassung der Literatur Pomsel (1980)**							
		1 Woche	4 Wochen	2 Monate	6 Monate	1 Jahr	3 Jahre	6 Jahre	ohne Angabe
WBC 10G/l	$\bar{x}$	8,28	8,28	8,01	10,03	9,96	8,53	7,53	8,02
	s	1,39	1,58	1,92	1,99	2,26	1,63	1,39	1,80
	n	427	566	668	377	7367	6745	6866	6372
RBC 10T/l	$\bar{x}$	7,20	7,84	8,43	8,66	7,50	6,03	5,93	6,36
	s	1,28	1,45	1,29	1,49	0,96	1,15	0,75	1,17
	n	340	911	1137	395	858	814	1956	3599
HGB mmol/l	$\bar{x}$	6,90	6,34	5,87	6,65	7,06	6,86	6,76	6,95
	s	1,49	1,43	1,65	1,37	1,32	1,66	1,3	1,21
	n	483	1851	3344	683	751	944	2352	5903
HCT l/l	$\bar{x}$	0,34	0,34	0,29	0,36	0,35	0,33	0,33	0,33
	s	0,03	0,05	0,05	0,05	0,04	0,03	0,06	0,03
	n	972	1175	2056	563	721	455	1929	5924
MCV fl	$\bar{x}$	47,78	42,99	34,64	41,5	47,20	55,22	55,99	52,20
	s	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.
	n	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.
MCH fmol	$\bar{x}$	0,96	0,81	0,70	0,77	0,94	1,14	1,14	1,09
	s	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.
	n	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.
MCHC %	$\bar{x}$	20,05	18,81	20,09	18,47	19,94	20,61	20,36	20,94
	s	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.
	n	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.

Fortsetzung Tab. 12:

Parameter / Einheit		Altersabhängige Referenzbereiche Zusammenfassung der Literatur Pomsel (1980)							
		1 Woche	4 Wochen	2 Monate	6 Monate	1 Jahr	3 Jahre	6 Jahre	ohne Angabe
Neutro. Gran. %	$\bar{x}$ s	40,99 10,11	33,09 6,16	27,27 5,71	26,29 9,31	27,67 10,87	31,61 10,09	32,04 7,82	33,39 8,45
	n	258	633	517	252	359	701	1334	3053
Lymph. %	$\bar{x}$ s	52,29 10,07	62,37 6,59	67,68 6,60	65,42 9,02	67,26 7,40	56,41 7,63	53,88 6,95	51,82 10,51
	n	258	634	520	213	2225	2628	3279	2264
Mono. %	$\bar{x}$ s	5,78 2,71	3,51 2,99	3,97 2,31	5,26 2,71	4,07 2,27	4,78 2,29	4,68 2,53	4,61 2,73
	n	260	659	581	232	742	528	997	2206
Eosin. Gran. %	$\bar{x}$ s	0,40 0,52	0,70 0,78	1,09 0,94	1,99 1,91	3,63 2,38	9,85 4,11	11,16 4,51	7,98 3,53
	n	723	723	579	277	580	711	1336	2857

Die hier von POMSEL (1980) wiedergegebenen Referenzbereiche sind auf die wichtigsten Altersgruppen beschränkt.

Auf den anschließenden Seiten erfolgt nun die Vorstellung der Eigenen Untersuchungen.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Probanden

Die Blutproben für die Softwareadaptation und Evaluierung des ADVIA 120 wurden von männlichen und weiblichen Patienten der Klinik für Wiederkäuer und Schweine (Innere Medizin und Chirurgie) der Justus-Liebig-Universität Gießen im Rahmen der täglichen Routinediagnostik entnommen. Untersucht wurden des weiteren Blutproben von gesunden Rindern, die im Zuge von IBR und BVD/MD Bestandsuntersuchungen in hessischen Milchviehbetrieben entnommen wurden. In Tabelle 13 ist die Rassen- und Geschlechterverteilung der insgesamt 245 untersuchten Tiere dargestellt. Das Alter der Tiere bewegte sich zwischen einem Tag und zwölf Jahren.

Tab. 13: Evaluierung ADVIA 120: Anzahl untersuchter Rinder, Rassen- und Geschlechterverteilung

Rassen	Anzahl	männlich	weiblich
RB	100	8	92
SB	110	7	103
RV	14	0	14
Sonstige	21	3	18
Summe	245	18	227

Die Erstellung der Referenzbereiche erfolgt anhand von 432 auswertbaren Blutproben aus zwölf hessischen und nordrhein-westfälischen Herdbuchzuchtbetrieben, wobei je sechs Betriebe pro Rasse besucht wurden. Insgesamt wurden 504 gesunde Tiere in die Untersuchung einbezogen. Von diesen Proben konnten 71 aufgrund von Thrombozytenverklumpung, geronnener Blutproben oder unsachgemäß befüllter Blutröhrchen nicht mit in die Untersuchung einbezogen werden.
Die Probenentnahme wurde im Winterhalbjahr (Anfang Dezember bis Mitte März) durchgeführt. Alle Tiere befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Stall. Drei Betriebe verfügten über Kurzstände mit Anbindehaltung, die restlichen Betriebe über einen Liegeboxenlaufstall. Kälber und Jungrinder wurden sowohl in Anbindehaltung als auch freilaufend in Gruppen gehalten. Es wurden nur weibliche Tiere in die Untersuchung einbezogen. Rinder acht Wochen vor und sowie zwölf Wochen nach der Kalbung wurden nicht mit in die Untersuchung aufgenommen.
Zur Feststellung des Gesundheitszustandes wurde eine ausführliche Anamnese erhoben und eine klinische Untersuchung durchgeführt. Auf eine Ermittlung der Körperinnentemperatur wurde zugunsten einer schnelleren Probenentnahme verzichtet, um den Einfluß durch Streß zu minimieren.
Das Grundfutter für laktierende Rinder, Färsen und Fresser bestand in allen Herden aus Gras- und Maissilage mit unterschiedlichen Leistungsfutterzusätzen. Die Kälber erhielten Milchaustauscher und dem Alter entsprechend Heu. Die durchschnittliche Jahresmilchleistung lag in den Betrieben mit Schwarzbunten Kühen etwa bei 8200 kg und in Fleckviehbetrieben um 6500 kg. Das ergibt einen Unterschied von 1700 kg Milch zwischen den Rassen. Der Betrieb mit der besten Herdenleistung erzeugte 10200 kg Milch pro Tier und Jahr (SB), die niedrigste Herdenleistung lag bei 5000 kg pro Tier und Jahr (DFV). In den Schwarzbuntenherden betrug die Spannweite der Herdenleistung 3500 kg Milch und in den Fleckviehherden 2500 kg
Die Altersverteilung der untersuchten Tiere ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 14: Erstellung von Referenzbereichen mit dem ADVIA 120: Anzahl untersuchter Rinder pro Rasse und Altersverteilung.

Alter	**Schwarzbunte Holsteien n = 213**		**Fleckvieh n = 219**		**Altersgruppengröße d. Referenzbereiche**	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	SB	DFV
1-6 Monate	19	8,9	21	9,5	19	21
6-12 Monate	15	7,0	17	7,7	89	63
12-24 Monate	74	34,7	46	20,9		
24-36 Monate	26	12,2	48	21,8	105	135
36-48 Monate	24	11,3	25	11,4		
>60 Monate	55	25,9	62	28,6		

3.1.1.1 Blutentnahme

Die Blutproben für die Evaluation des ADVIA 120 wurden mit einer sterilen Einmalkanüle (17 bzw. 18 G) durch Punktion der mittels Staukette gestauten Vena jugularis gewonnen. Das frei ablaufende Blut wurde in einem 4 ml

Probengefäß (Fa Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen. Die Untersuchung der Blutproben wurde innerhalb von vier Stunden nach der Entnahme durchgeführt.

Die Blutproben zur Erstellung der Referenzbereiche wurden durch Punktion der Vena coccygica gewonnen. Bei Tieren unter fünf Monaten erfolgte die Blutentnahme aus der Vena jugularis. Das frei ablaufende Blut wurde mit einem 4 ml Probengefäß (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen und durch K_3-EDTA ungerinnbar gemacht. Die Proben wurden innerhalb von fünf Stunden nach der Blutentnahme am ADVIA 120 gemessen.

3.1.1.2 Antikoagulanzien

Als Antikoagulanz wurde zur Durchführung der Evaluation $Kalium_3$-EDTA verwendet. Der Einfuß unterschiedlicher Antikoagulanzien auf das Meßergebnis wurde für Lithium-Heparin und Natrium-Citrat untersucht. Eine sorgfältige Durchmischung der Blutrobe mit dem Antikoagulanz erfolgte durch wiederholtes Über-Kopf-Drehen des Probenröhrchens.

3.1.2 Hämatologiesystem ADVIA 120

Das Hämatologiesystem ADVIA 120 (Fa. Bayer Diagnostic, Fernwald), ist ein Mehrkanal-Analysensystem zur hämatozytologischen Diagnostik. Die Laboreinheit besteht aus dem Analysensystem, mit der UFC-(Unified Fluidic Circuit)Technik (1), integrierten Reagenzien (2) und technischen Bauteilen (3), dem automatischem Probennehmer (4), dem Barcodeleser (5), dem Vorratsbehälter für die Spül- und Mantelstromflüssigkeit (6) und dem Abfallbehälter für gebrauchte Reagenzien (7). Die folgende Übersicht zeigt das Analysensystem des Hämatologiesystems ADVIA 120.

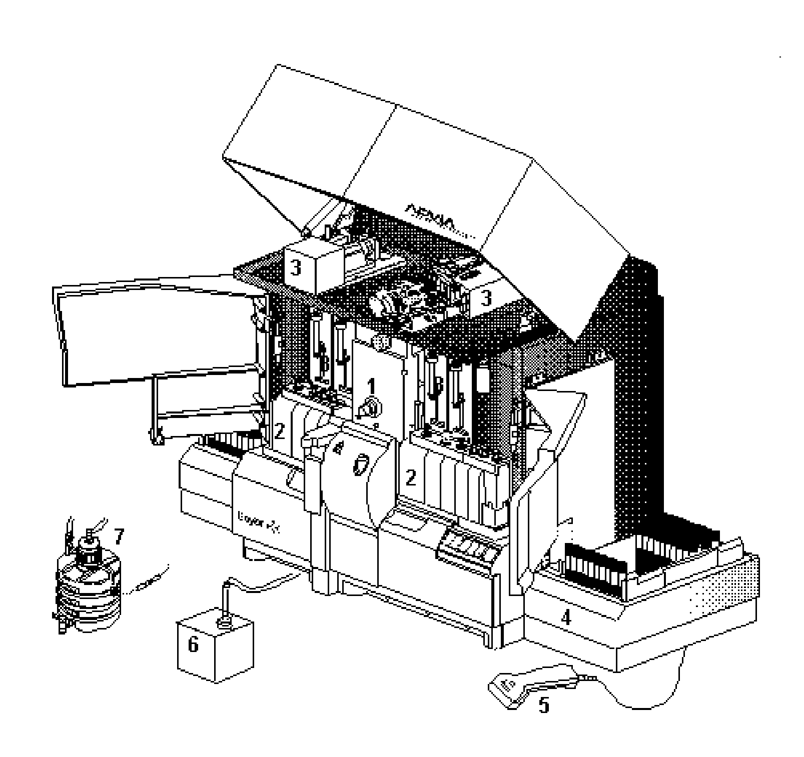


Abb. 04: ADVIA 120 Fa. Bayer

Die Kennzeichnung der Probe und die Darstellung der Ergebnisse erfolgen mittels eines Computerprogramms, das hinsichtlich seiner Benutzeroberfläche mit den Programmen von Microsoft vergleichbar ist. Da ein großer Teil dieser Arbeit nur mit

Hilfe der Systemsoftware des ADVIA 120 zu bewältigen war, sollen im nächsten Kapitel einzelne Funktionen vorgestellt werden.

3.1.2.1 Software

Die Einsatzmöglichkeiten des ADVIA 120 werden durch die installierte Software festgelegt. Der Benutzer kann zwischen einer Human– und einer Multi-Spezies-Software wählen. Die Multi Spezies Version verfügt über Voreinstellungen für die folgenden 20 Spezies und Subspezies: Hund, Katze, Schwein, Pferd, Schaf, Ziege, Rind, Meerschweinchen, Cynomolgus- und Rhesusaffe, Kaninchen, Ratte, Maus und Mensch. Bei der Auswahl der Probenanforderung kann bei der Multi-Spezies-Version V.1.1.07-MS die gewünschte Tierart ausgewählt werden (Abbildung 5: Nr. 4).

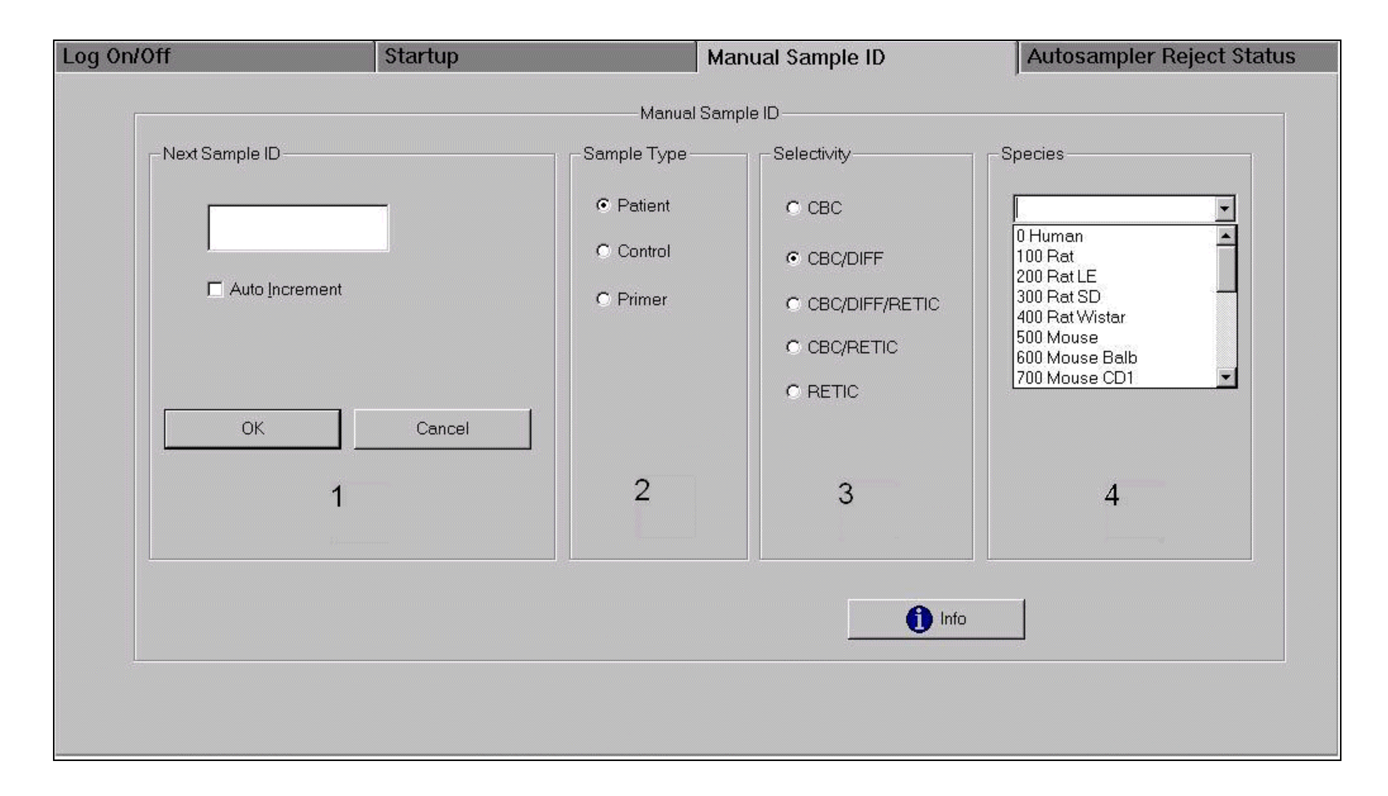


Abb. 05: ADVIA 120: Bildschirm zur Probenidentifikation im manuellen Ansaugmodus.

Die Kennzeichnung der Proben erfolgt durch die Vergabe einer Patientenidentifikation (Abbildung 5 Nr.**1**). Der Probentyp (Kontrolle, Patient oder Primer = NaCl) kann im Feld **2** gewählt werden.

Zur Untersuchung von Patientenblut kann zwischen fünf Analysenmodi (Selectivity) gewählt werden (Abbildung 5 Nr. 3).

Kleines Blutbild..(CBC)
Großes Blutbild..(CBC/DIFF)
Großes Blutbild und Retikulozytenanalytik.....(CBC/DIFF/RETIC)
Kleines Blutbild und Retikulozytenanalytik..............(CBC/RETIC)
Retikulozytenanalytik...(RETIC)

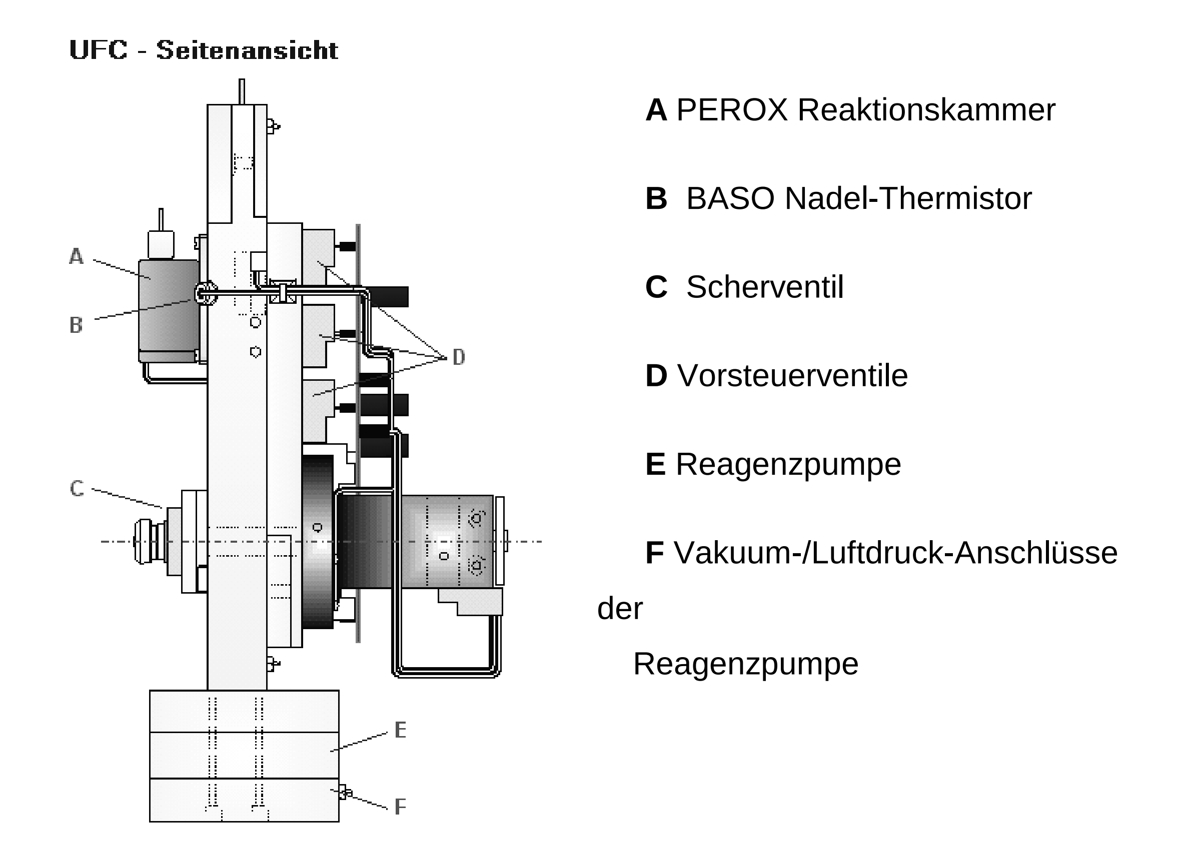
Die in Klammern angegebenen Abkürzungen entsprechen den vom Hersteller verwendeten Bezeichnungen zur Auswahl des Analysemodus. Der Probendurchsatz beträgt 120 große und/oder kleine Blutbilder in 60 Minuten. Wählt der Benutzer zusätzlich oder ausschließlich die Retikulozytenanalytik, verringert sich der maximale Probenumsatz auf 72 Blutbilder in 60 Minuten.

3.1.2.2 Arbeitsweise

Die Proben können über den automatischen Probennehmer (ACTS), den manuellen Probennehmer für geschlossene Probenröhrchen (MCTS) oder über den manuellen Probennehmer für offene Probenröhrchen (MOTS) angesaugt werden. Das Aspirationsvolumen beträgt bei allen Ansaugmodi 155 µl. Aus dem angesaugten Probenvolumen werden am Probenscherventil fünf Aliquote gebildet und in verschiedenen Reaktionskammern bearbeitet. Das so aufbereitete Blut wird im UFC (Unified Fluidic Circuit) den einzelnen Meßmethoden zugeführt. Die folgende Abbildung zeigt den UFC-Block. Er besteht aus acht Acrylplatten. In diese Platten sind die Kanäle für die Flüssigkeiten und den Luftstrom, die Ventile und vier Reaktionskammern eingearbeitet. Die PEROX-Reaktionskammer ist an der

Außenseite des UFC-Blocks montiert. Die Reagenzpumpe, die unten am UFC-Block montiert ist, besteht ebenfalls aus Acryl. Die Pumpe ist mit einer Membran mit sieben einzelnen Pumpenbereichen ausgerüstet, die als Diaphragmen dienen und die Reagenzien in die Reaktionskammern befördern.

Auf Abbildung 6 ist der UFC-Block dargestellt.



A PEROX Reaktionskammer

B BASO Nadel-Thermistor

C Scherventil

D Vorsteuerventile

E Reagenzpumpe

F Vakuum-/Luftdruck-Anschlüsse der Reagenzpumpe

Abb. 06: ADVIA 120: UFC-Block - Seitenansicht (aus ADVIA (TM) 120 Hematology System Benutzerhandbuch: Willkommen bei ADVIA 120 V1.03.00 Copyright © 1997, 1998 Bayer Corporation)

In den nun folgenden Kapiteln werden Meßmethoden und Ergebnisdarstellung des ADVIA 120 näher erläutert.

3.1.2.2.1 Hämoglobinmethode

Der Gesamthämoglobingehalt (HGB) wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 546 nm ermittelt. Die Aufbereitung der Probe erfolgt in der Hämoglobinreaktionskammer (Kolorimeter), mittels der Cyanmethämoglobin – Methode, gemäß einer modifizierten ICSH–Richtlinie. Zur Messung werden die Erythrozyten lysiert und bei 546 nm das freigesetzte Hämoglobin in der Durchflußkolorimeterküvette bestimmt.

3.1.2.2.2 Basophilen- Kernsegmentierungsmethode

Die Gesamtleukozytenzahl (LeukoB) und der absolute bzw. prozentuale Anteil der basophilen Granulozyten wird im Erythrozyten/Thrombozyten/Kernsegmentierungs-Kanal bestimmt. Durch eine Behandlung mit Phtalsäure (pH 2) werden alle Zellen außer basophile Granulozyten bei 32 – 34 °C „gestrippt”. Beim sogenannten „cytoplasmatic stripping“ werden die Zellen durch eine oberflächenaktive Substanz vom Zytoplasma getrennt, so daß nur noch der Nukleus erhalten bleibt. Thrombozyten und Erythrozyten werden vollständig lysiert. Die Zellen in der solchermaßen vorbereiteten Zellsuspension werden in der Flußzelle mit Laser-Streulicht durchleuchtet (siehe Kapitel 2.2.3), das austretende Streulicht in elektrische Signale umgewandelt und in jeweils 50 Kanälen (x-, y-Achse) gezählt. Die Ergebnisse des Großwinkelstreulichtsignals werden auf der x-Achse (Dichte des Kernchromatins) des Nukleogramms aufgetragen. Die Ergebnisse des Kleinwinkelstreulichtsignals werden auf der y-Achse (Zellkerngröße) des Nukleogrammes aufgetragen. Abbildung 7 zeigt Nukleogramme vom Mensch (A) und Rind (B). Im Feld Nr. 1 liegt die Population der intakten basophilen Granulozyten, die durch ihre Größe leicht von den übrigen Zellklassen getrennt werden kann. Unter der Basophilenpopulation liegen die Zellkerne der mononukleären Zellen (MN) Feld Nr. 2 und im Feld Nr. 3 die der polymorphkernigen (PMN) Zellen. Die PMN-Punktwolke (Cluster) enthält die Zellen der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Im MN-Cluster erscheinen Lymphozyten und Monozyten.

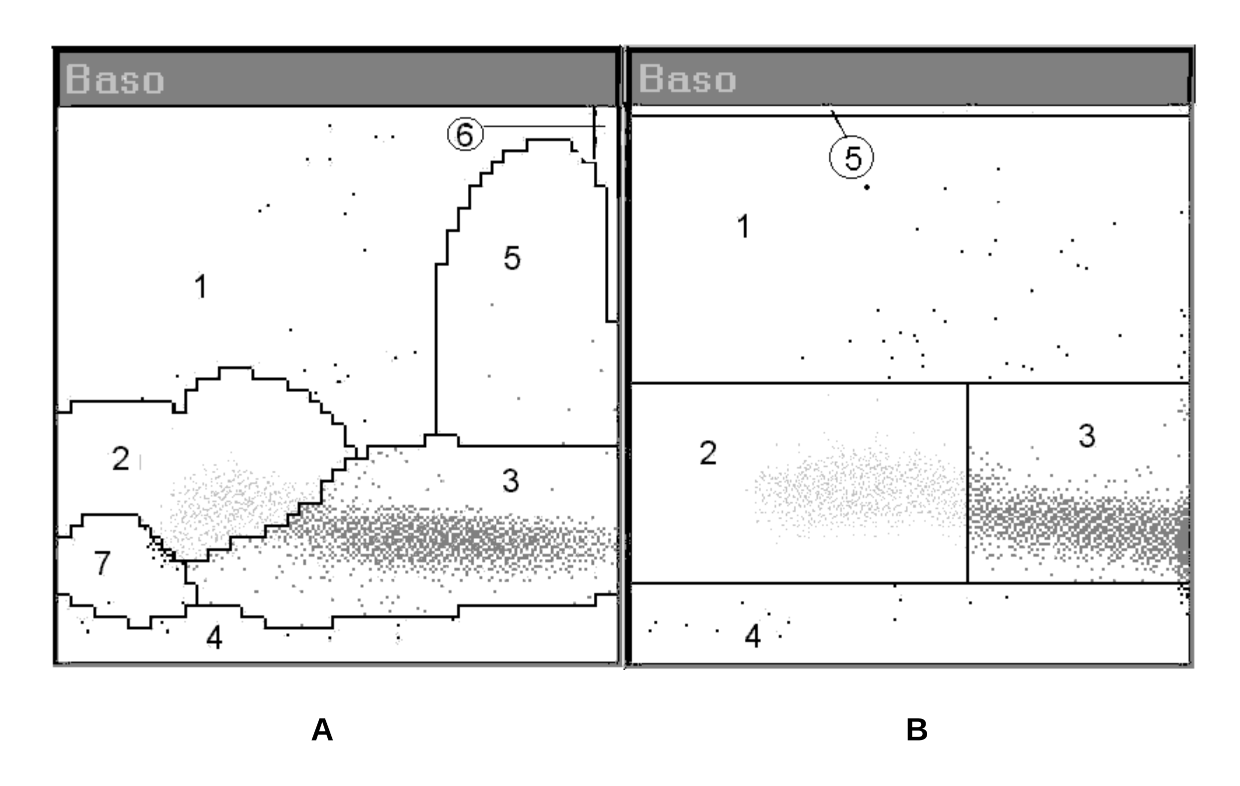


Abb. 07: ADVIA 120 Nukleogramm; **A**: Mensch; **B**: Rind Nr.224

1 Basophile Granulozyten
2 Mononukleäre Leukozyten (Monozyten- und Lymphozytenkerne)
3 Polymorphkernige Leukozyten (Zellkerne von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten)
4 Rauschen
5 lyseresistente große Leukozyten
6 Sättigung
7 Blasten-Zellkerne

Feld Nr. 4 (Rauschen) enthält Zellbruchstücke, Thrombozyten und Erythrozytenstroma. Im Feld Nr. 5 (Basosuspekt) werden lyseresistente große Leukozyten dargestellt, die nicht zu den basophilen Granulozyten gezählt werden. Feld Nr. 6 (Sättigungsbereich) und Nr. 7 (Blastenzellkerne) sind im Rindernukleogramm nicht eingerichtet. Der Sättigungsbereich enthält Luftblasen und Koinzidenzen.

Die Grenzlinien (treshhold) zwischen den Populationen sind im Rindernukleogramm unflexibel im Gegensatz zur Einstellung der Humansoftware. Die einzige Ausnahme

bildet hier die Trennung von MN- und PMN-Cluster.
Diese Grenze wird im Humannukleogramm verwendet, um den Lobularitätsindex (LI) zu berechnen, mit dem das Signal "Linksverschiebung" angezeigt wird. Diese Warnmeldung ist beim Rind zur Zeit (derzeitige Multispeziessoftware Version MS-V 1.1.07 des ADVIA 120 BAYER, 1999) nicht aktiv.

3.1.2.2.3 Peroxidasemethode

Im Peroxidasekanal wird neben der Gesamtleukozytenzahl (LeukoP) der prozentuale und absolute Anteil der Monozyten und Lymphozyten, sowie der Anteil neutrophiler, eosinophiler und basophiler Granulozyten bestimmt. Zusätzlich werden Große-Ungefärbte-Zellen (LUC = Large Unstained Cells) in absoluter Anzahl und als prozentualer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl ermittelt. Zu der Gruppe der LUC gehören Blasten und atypische Lymphozyten, die aufgrund mangelnder Peroxidaseaktivität nicht angefärbt werden.

Das dem Peroxidasekanal zugeführte Probenvolumen wird bei 64 – 72 °C mit drei unterschiedlichen Reagenzien bearbeitet. Perox 1-Reagenz (Natriumlaurylsulfat und Brij-35) lysiert die enthaltenen Erythrozyten und fixiert mittels Formaldehyd die Leukozyten. Die Leukozyten werden durch die Zugabe von 4-Chloro-1-Naphtol (PEROX 2-Reagenz), das in Verbindung mit Wasserstoffperoxid (PEROX 3-Reagenz) die endogene zelluläre Peroxidase als einen dunklen Niederschlag sichtbar macht, angefärbt. Ein konstantes Volumen der Zellsuspension wird danach der Flußzelle zugeführt. Bei der Passage durch die Flußzelle wird der Probenstrom mit Halogenlicht bestrahlt; dabei werden die Absorption (Peroxidasefärbung) und die Lichtstreuung (Zellvolumen) ermittelt. Diese Meßwerte werden in ein Koordinatensystem eingetragen. Die x – Achse entspricht der Absorption bzw. der Farbintensität. Auf der y - Achse werden die Ergebnisse der Streulichtmessung (Volumen) aufgetragen. Beide Achsen sind in jeweils 100 Zähl-Kanäle unterteilt. Zellen von ähnlicher Peroxidaseaktivität und ähnlichem Volumen liegen im Peroxidasezytogramm in einer Region. Mittels Cluster-Analyse wird zunächst jede Population aufgrund Position, Bereich und Dichte identifiziert. Nach der Identifikation erfolgt die Verarbeitung der Zellzahl jeder einzelnen Population. Dabei werden die Linien, welche die verschiedenen Zellpopulationen trennen, auf der Basis einer

probenweisen Berechnung von der Software durchgeführt. Abbildung 8 zeigt ein Peroxidasezytogramm eines Rind und eines Menschen.

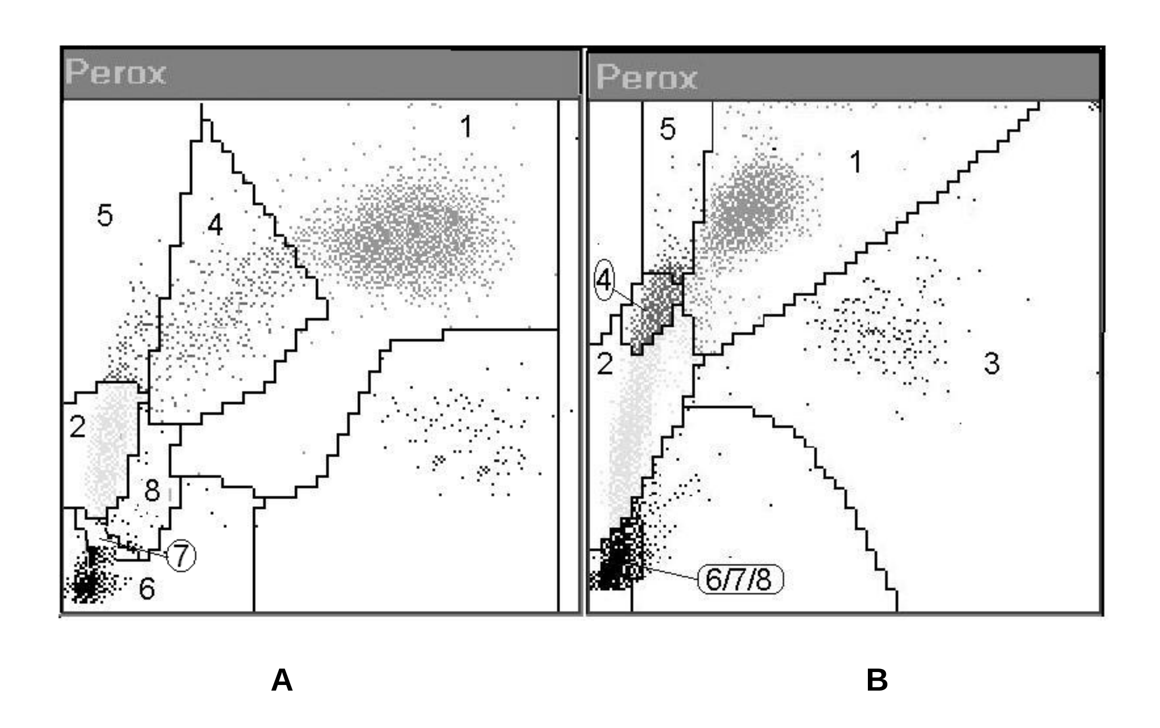


Abb. 08: ADVIA 120: Peroxidasezytogramm ; **A**: Mensch; **B**: Rind Nr.224

1 Neutrophile Granulozyten
2 Lymphozyten und basophile Granulozyten
3 Eosinophile Granulozyten
4 Monozyten
5 Große Ungefärbte Zellen (LUC)
6 Thrombozytenaggregate
7 Normoblasten
8 Rauschen

Die Populationen der neutrophilen (Feld Nr. 1) und der eosinophilen (Feld Nr. 3) Granulozyten können im Peroxidasezytogramm durch ihre Größe und ausgeprägte Peroxidaseaktivität beim Rind leicht abgegrenzt werden.

Die eosinophilen Granulozyten besitzen die größte Peroxidaseaktivität. Ihre Größe

überragt die der Neutrophilen. Durch die hohe Peroxidaseaktivität wird jedoch Streulicht von der zellulären Granula nicht durchgelassen und so eine kleineres Volumen vorgetäuscht. Durch diesen Effekt bereitet die Isolation dieser Zelltypen beim Rind und beim Menschen keine Schwierigkeiten. Die Anzahl der Lymphozyten wird durch Abzug der basophilen Granulozytenzahl von den nahezu Peroxidase negativen Zellen aus Feld Nr. 2 berechnet. Monozyten werden im Feld Nr. 4 gezählt. Sie weisen beim Rind eine geringere Peroxidaseaktivität auf als diejenigen des Menschen. Im Feld Nr. 5 wird die Zellgruppe der LUC bestimmt und beim Differentialblutbild ausgewiesen. Liegt der Anteil von LUC über einem festgesetzten Prozentwert, wird das Ergebnis mit einem Stern gekennzeichnet und die Probe muß erneut gemessen bzw. einer manuellen Untersuchung unterzogen werden. Normoblasten, Thrombozytenaggregate und „Rauschen" (Felder Nr. 6/7/8) werden beim Rind zu einem Ereignisfeld zusammengefaßt. Die Ergebnisse für die Gesamtleukozytenzahl aus dem Peroxidasekanal werden mit den Ergebnissen aus dem Basokanal verglichen. Bei auftretenden Unterschieden werden die betroffenen Ergebnisse mit einem Stern gekennzeichnet und eine Fehlermeldung angezeigt. Durch eine interne Plausibilitäts- und Fehlerkontrolle überwacht das System die Ergebnisse, so daß Fehlmessungen eindeutig zu erkennen sind und die Probe einer erneuten Überprüfung unterzogen werden kann. In der nun folgenden Abbildung sind alle von einer Messung im System verfügbaren Daten aus dem Peroxidasekanal dargestellt.

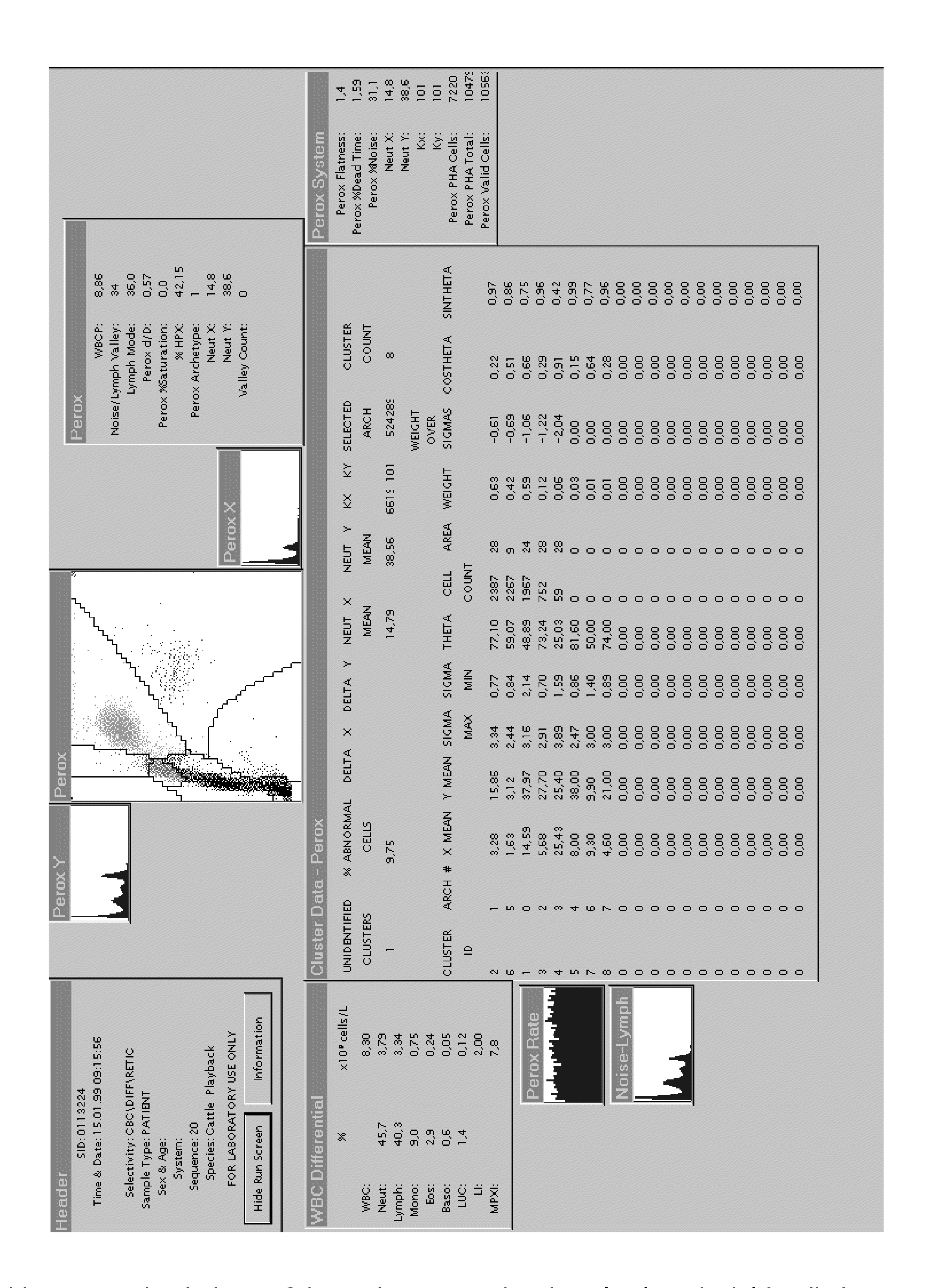


Abb. 09: Ausdruck der Meßdaten des Peroxydasekanals als Beispiel für die im System verfügbaren Informationen zu einer Meßmethode (Rind Nr.224).

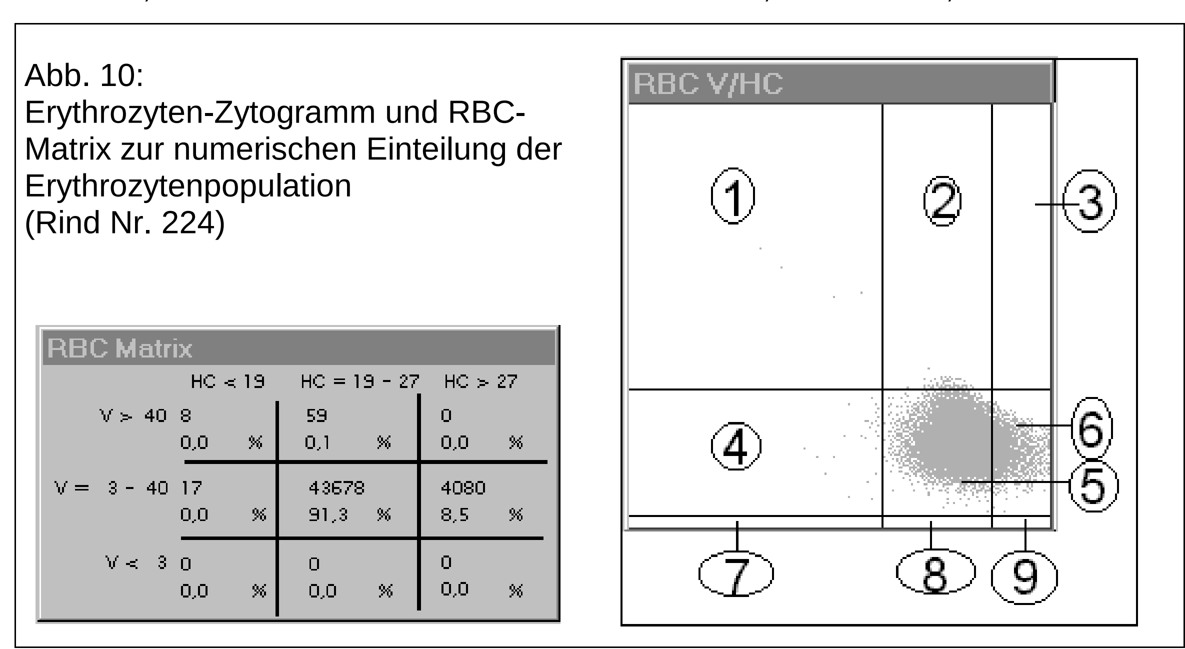
Man kann zwischen den Informationen zur Überwachung des Meßvorgangs und klinisch relevanten Meßwerten unterscheiden. Zur Auswertung einer gemessenen Probe werden das Feld „Header” mit den Identifikationsdaten, das Peroxydasezytogramm und die Ergebnisse aus dem Feld WBC Differential herangezogen.
Die übrigen Histogramme und Tabellen dienen der Überwachung des Meßvorgangs und können bei Fehlermeldungen zur Aufklärung der Störung herangezogen werden. Die Tabelle „Cluster Data Perox” enthält die Meßwerte zur Erstellung der Punktwolken. „Perox Y" und „Perox X" geben die Meßpunkte auf den Achsen wieder. Mit dem Feld „Perox Rate" ist die Kontrolle des Messvorgangs in der Flußzelle möglich. Im Histogramm „Noise-Lymph" ist das Rauschen im Lymphozytencluster dargestellt und die Tabellen „Peroxsystem" und „Perox" enthalten Systemwerte der Peroxidasemessung.

3.1.2.2.4 Erythrozytenmethode

Bei der Anfertigung des roten Blutbildes werden die im folgenden aufgezählten Meßgrößen erhoben: Erythrozytengesamtzahl (RBC), Hämoglobinkonzentration (HGB), Hämatokritwert (HCT), mittleres Erythrozytenvolumen (MCV), mittlerer zellulärer Hämoglobingehalt der Erythrozyten (MCH), mittlere errechnete zelluläre Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten, (MCHC), mittlere gemessene zelluläre Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (CHCM), zellulärer Hämoglobingehalt (CH), Hämoglobinverteilungsbreite (HDW) sowie der Variationskoeffizient der Erythrozytenverteilungsbreite (RDW).

Die Erythrozyten werden in der Ery-Reaktionskammer mit Natriumdodecylsulfat (SDS) isovolumetrisch aufgekugelt und mit Glutaraldehyd fixiert. Durch die Fixation wird eine Hämolyse infolge Einwirkung von SDS verhindert (ZELMANOVIC et al., 1992). Die chemisch aufbereitete Probe wird zur Flußzelle im Erythrozyten/Thrombozyten/Kernsegmentierungs-Kanal geleitet. Hier erfolgt die Erfassung der Kleinwinkelstreulichtsignale, die dem Zellvolumen entsprechen und die der Großwinkelstreulichtsignale zur Bestimmung der zellulären Hämoglobinkonzentration. Abbildung 11 ist die graphische Darstellung im RBC-

Scatter. Unter Verwendung der Mie–Theorie über die Lichtstreuung homogener Sphären werden die Streulichtsignale für jede Zelle in Hämoglobinkonzentration und Volumen umgerechnet. Die so erhaltenen Werte werden in das lineare Volumen/Hämoglobin-Zytogramm (RBC V/HC) aufgetragen, das eine sehr gute Darstellung der Erythrozytenmorphologie bietet. Abbildung 10 zeigt Volumen/Hämoglobin-Zytogramm und die RBC-Matrix. Die Erythrozytenpopulation wird bei dieser Darstellung in neun Gruppen aufgeteilt. In Gruppe 1 befinden sich hypochrom makrozytäre Erythrozyten, in Gruppe 2 und 3 makrozytäre normochrome und hyperchrome Erythrozyten. Gruppe 4, 5 und 6 unterteilt die normozytären Erythrozyten in hypochrom, normochrom und hyperchrom. In den Gruppen 7, 8 und 9 erfolgt die Unterscheidung der mikrozytären Erythrozyten in hypochrom, normochrom und hyperchrom. Die Schwellenwerte für das Volumen sind V < 3 fl, V = 3-40 fl, V > 40 fl und für den HGB-Gehalt HC < 19, HC = 19-27, HC > 27.



RBC Matrix

	HC < 19	HC = 19 - 27	HC > 27
V > 40	8 0,0 %	59 0,1 %	0 0,0 %
V = 3 - 40	17 0,0 %	43678 91,3 %	4080 8,5 %
V < 3	0 0,0 %	0 0,0 %	0 0,0 %

Abb. 10:
Erythrozyten-Zytogramm und RBC-Matrix zur numerischen Einteilung der Erythrozytenpopulation
(Rind Nr. 224)

In der RBC-Matrix werden die absoluten und prozentualen Zellzahlen für jedes Feld wiedergegeben. Aus diesen Darstellungen lassen sich in kurzer Zeit alle wichtigen Informationen über die Erythrozytenmorphologie entnehmen. Bei jeder Messung wird eine interne Plausibilitätskontrolle durchgeführt. Dies geschieht durch den Vergleich von gemessener mittlerer Hämoglobinkonzentration (CHCM) mit dem berechnetem Wert (MCHC). Weichen diese Werte um mehr als 5 % voneinander ab, werden die

betroffenen Parameter „besternt" und das System gibt für diese Messung eine Fehlermeldung aus.
Im Verlauf eines Zählvorgangs, der 10 Sekunden dauert, werden ca. 50 000 Erythrozyten und 3000 Thrombozyten beurteilt.

3.1.2.2.5 Thrombozytenmethode

Die Thrombozytenzählung erfolgt gleichzeitig mit der Erythrozytenzählung in einem Arbeitsschritt. Neben der Plättchenzahl (PLT) werden bei der 2D-Thrombozytenmessung die im weiteren aufgezählten Parameter aufgenommen: mittleres Thrombozytenvolumen (MPV), Thrombozytenvolumenverteilungsbreite (PDW), Thrombokrit (PCT), mittlere Thrombozytendichte (MPC) — dies entspricht dem CHCM der Erythrozyten —, Thrombozytendichteverteilungsbreite (PCDW), mittlere Thrombozytenmasse (MPM) und deren Verteilungsbreite (PMDW), große Thrombozyten (Large PLT), Erythrozyten-Fragmente und leere Membranen (RBC - fragments, ghost) sowie die Anzahl der Thrombozytenaggregate (PLT clumps).

Die chemische Aufbereitung gleicht der der Erythrozyten (s. Kapitel 3.1.2.2.4). Die aufgekugelten Thrombozyten werden in der Flußzelle von einem Laserstrahl durchleuchtet. Entstehendes Streulicht wird im Großwinkel um das 12-fache und im Kleinwinkel 30-fach verstärkt. Die Signale der Thrombozyten werden in ein Zytogramm übertragen. Abbildung 11 zeigt das RBC-Scatter mit der Thrombozytenwolke. Eine Vergrößerung der Thrombozytenwolke aus Abbildung 11 ist das PLT/Volume/PC-Zytogramm (Abbildung 13).

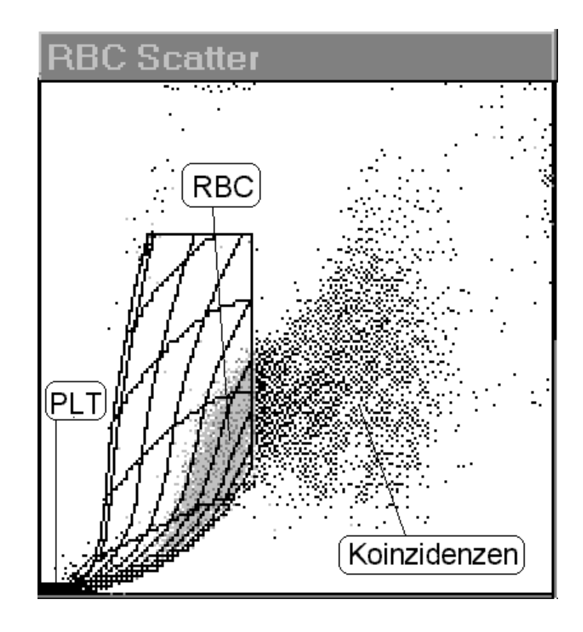


Abb. 11: Erythrozytenscattergramm (Rind Nr. 224)

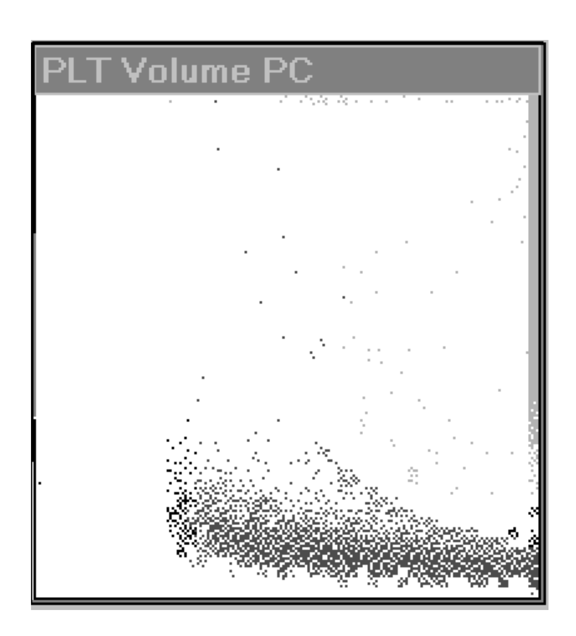


Abb. 12: Thrombozytenzytogramm (Rind Nr. 224)

Die verstärkten Thrombozytensignale werden im Thrombozytenzytogramm (PLTVolume PC) (Abbildung 12) dargestellt. Auf der X- Achse wird die Dichte (Brechungsindex) von 0 – 40 g/dl aufgetragen und auf der Y- Achse das Thrombozytenvolumen von 0 – 60 fl. Abbildung 13 zeigt das PLT-Scattergramm. Dargestellt sind die Zusammenhänge von Brechungsindex und Volumen der Zellpopulation.

1 Thrombozytenwolke
2 große Thrombozyten
3 Erythrozyten
4 Erythrozyten-Fragmente
5 Zelltrümmer
6 leere Erythrozytenmembranen
n = oberer und unterer Brechungsindex

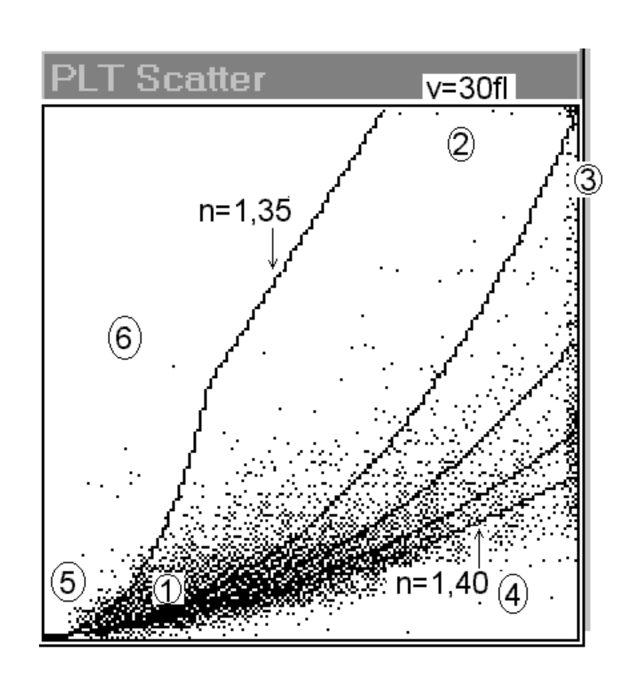


Abb. 13: Thrombozytenzytogramm (PLT: 784 G/l, MPV: 5,5fl, MPC: 26,6 g/dl) (Rind Nr. 224)

3.1.2.2.6 Retikulozytenmethode

Der ADVIA 120 gibt bei der Retikulozytenanalytik folgende Parameter aus: Retikulozytenzahl (Retic) sowie Retikulozyten mit geringem (L-Retic), mittlerem (M-Retic) und hohem (H-Retic) Gehalt an RNA in Prozent und als Absolutwert. Weiterhin werden das mittlere Retikulozytenvolumen (rMCV) und die mittlere Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten (rCHCM) bestimmt.
Die Aufbereitung der Probe erfolgt auf die gleiche Weise wie bei den Erythrozyten.

Die aufgekugelten Zellen werden mit dem Chromogen Oxaxin 750 gefärbt, um vorhandene RNA anzufärben. Mit Hilfe der Lichtabsorptionsmessung kann zwischen vier Reifungsstufen der Erythrozyten unterteilt werden:

1. Reife Erythrozyten ohne RNA (Neg RBC)
2. Retikulozyten mit geringem RNA – Gehalt (L RETIC)
3. Retikulozyten mit mittlerem RNA- Gehalt (M RETIC)
4. Retikulozyten mit hohem RNA- Gehalt (H RETIC)

Die Signale des Großwinkelstreulichts werden auf der x-Achse des Retikulozytenzytogramms aufgetragen und geben den Grad der Absorption des Lichtes wieder. Zellen mit hohem RNA-Gehalt befinden sich in Abbildung 14 in Feld D. Aus den Kleinwinkelstreulichtsignalen läßt sich Größe der Zellen ableiten; diese Werte sind auf der Y-Achse des Retikulozytenzytogramms zu finden. Im Feld E werden die Signale von Thrombozyten abgebildet und im Feld F werden Koinzidenzen von der validen Zellgruppe ausgegrenzt. Die nun folgende Abbildung zeigt das pathologisch veränderte Blutbild eines 14 Monate alten DRB-Rindes. Auf der Abbildung 15 sind die Ergebnisse des kleinen Blutbildes und der Retikulozytenanalytik zusammengefaßt.

1 – **6** Schwellenwerte zwischen den Zellgruppen.
A Erythrozyten
B Retikulozyten hoher Reifung
C Retikulozyten mittlerer Reifung
D Retikulozyten niedriger Reifung
E Thrombozyten
F Koinzidenzen

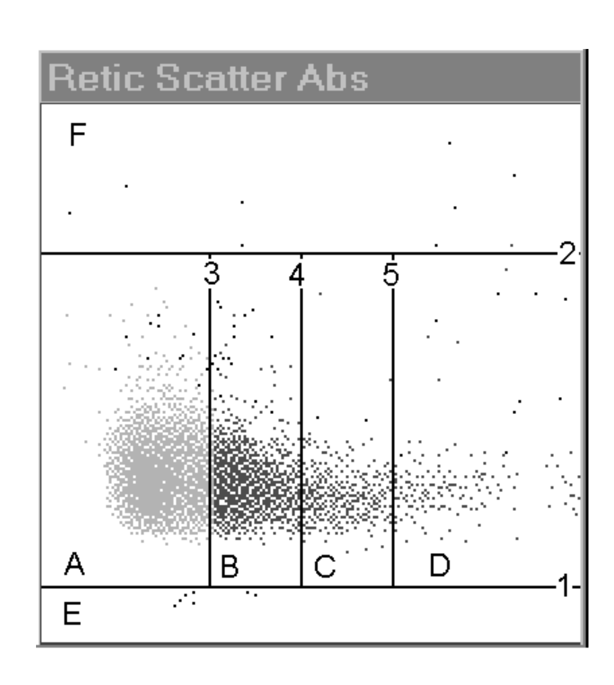


Abb. 14: Retikulozytenzytogramm (Rind mit hämolytischer Anämie)

Retic

	%	#
Neg RBC:	77,7	8623
Retic:	22,3*	284,8 *
L Retic:	78,4	1938
M Retic:	15,7	388
H Retic:	5,9	147
IRF-H:	5,9	
IRF-M+H:	21,6	
RTC Cells Acquired:		11980
RTC Cells Analyzed:		11151
RTC Gated Cells:		11096
Retic Count:		2473

CBC

WBC:	10,40	*	$\times 10^9$ cells/L
RBC:	1,28		$\times 10^{12}$ cells/L
HGB:	1,8		m mol/L
HCT:	0,108		L/L
MCV:	84,2		fL
MCH:	1,41		fmol
MCHC:	16,71		m mol/L
CHCM:	18,05		m mol/L
CH:	1,49		fmol
CHDW:	0,32		fmol
RDW:	26,4		%
HDW:	2,28		m mol/L

Abb. 15: Retikulozytenparameter, Erythrozytenparameter und Leukozytenzahl

Rind mit hämolytischer Anämie: Retikulozyten: 284,8 G/l (22,3 %), Erythrozyten: 1,28 T/l, Hämatokritwert: 0,108 l/l, Hämoglobin: 1,8 mmol/l).

In den nun anschließenden Kapiteln 3.1.3 und 3.1.4 erfolgt die Vorstellung der Vergleichsgeräte der Evaluation des ADVIA 120.

3.1.3 Hämatologiesystem Technicon H*1

Das Hämatologiesystem Technicon H*1 (Fa. Bayer Diagnostic, Fernwald) ist ein Vorläufer des ADVIA 120. Daher wird in diesem Kapitel der Beschreibung der technischen Unterschiede zum ADVIA 120 größere Aufmerksamkeit geschenkt, als der erneuten Beschreibung identischer Einzelheiten.

Der H*1 ist ein automatisches Analysesystem zur Erstellung großer und kleiner Blutbilder. Der Meßvorgang beruht auf dem Prinzip der Durchflußzytometrie mit optoelektronischer Zellzählung. Der maximale Probenumsatz pro Stunde beträgt bei einem großen Blutbild 60 und einem kleinen Blutbild 80 Untersuchungen. Das Ansaugvolumen beträgt 100 µl durch EDTA antikoaguliertes Blut. Die Ergebnisse können in neun verschiedenen Analysemodi dargestellt werden. Report 1-3 stellt die

Ergebnisse mit jeweils unterschiedlicher Gewichtung auf das weiße und rote Blutbild dar. Die Untersuchungsmodi Labor 1-3 und Research 1-3 dienen der Überwachung des Meßvorgangs. Die Multi-Spezies-Software ermöglicht Blutuntersuchungen von Humanproben und von Tierproben (Hund, Katze, Kaninchen, Maus, Pferd, Ratte).

Die Probenaufbereitung und das Messverfahren zur Feststellung des Hämoglobingehaltes und die Messung im Basophilen-Kernsegmentierungskanal sowie im Peroxidasekanal gleicht der beim ADVIA 120 beschriebenen Technik.
Die Aufbereitung der Erythrozyten und Thrombozyten beruht ebenfalls auf dem beim ADVIA 120 beschriebenen Prinzip. Unterschiedlich ist hier die Ergebnispräsentation. Während die Erythrozytenparameter keiner Veränderung unterliegen, ist die Thrombozytendiagnostik im Vergleich zur 2-D-Technik des ADVIA 120 stark eingeschränkt. Da es sich beim Technikon H 1 um eine eindimensionale Analyse handelt, werden nur die Thrombozytenzahl, der Thrombokrit und das mittlere Thrombozytenvolumen inklusive der Verteilungsbreite angegeben.

Auf der folgenden Abbildung ist der Ausdruck Report 1 von Rind Nr. 225 dargestellt. Report 1 beinhaltet Leukozytenzahl (Leuko), Erythrozytenzahl (Ery), Hämoglobingehalt (HGB), Hämatokritwert (HCT), mittleres Erythrozytenvolumen (MCV), mittlerer Hämoglobingehalt (MCH), mittlere Hämoglobinkonzentration (MCHC), Erythrozytenverteilungsbreite (EVB), Hämoglobinverteilungsbreite (HVB), Thrombozytenzahl (THROMB), mittleres Thrombozytenvolumen (MTV), Thrombozytenverteilungsbreite (TVB) und der Thrombokrit (TKT). Sofern ein großes Blutbild angefordert wurde, werden die absoluten und prozentualen Werte für das Differentialblutbild zusätzlich gemessen und angegeben.
Graphische Darstellung sind das "Ery-" und "Throm. VOL"-Histogramm, "HGB KONZ"-Histogramm sowie "PEROX"-, "BASO"- und "ERY"-Zytogramm.

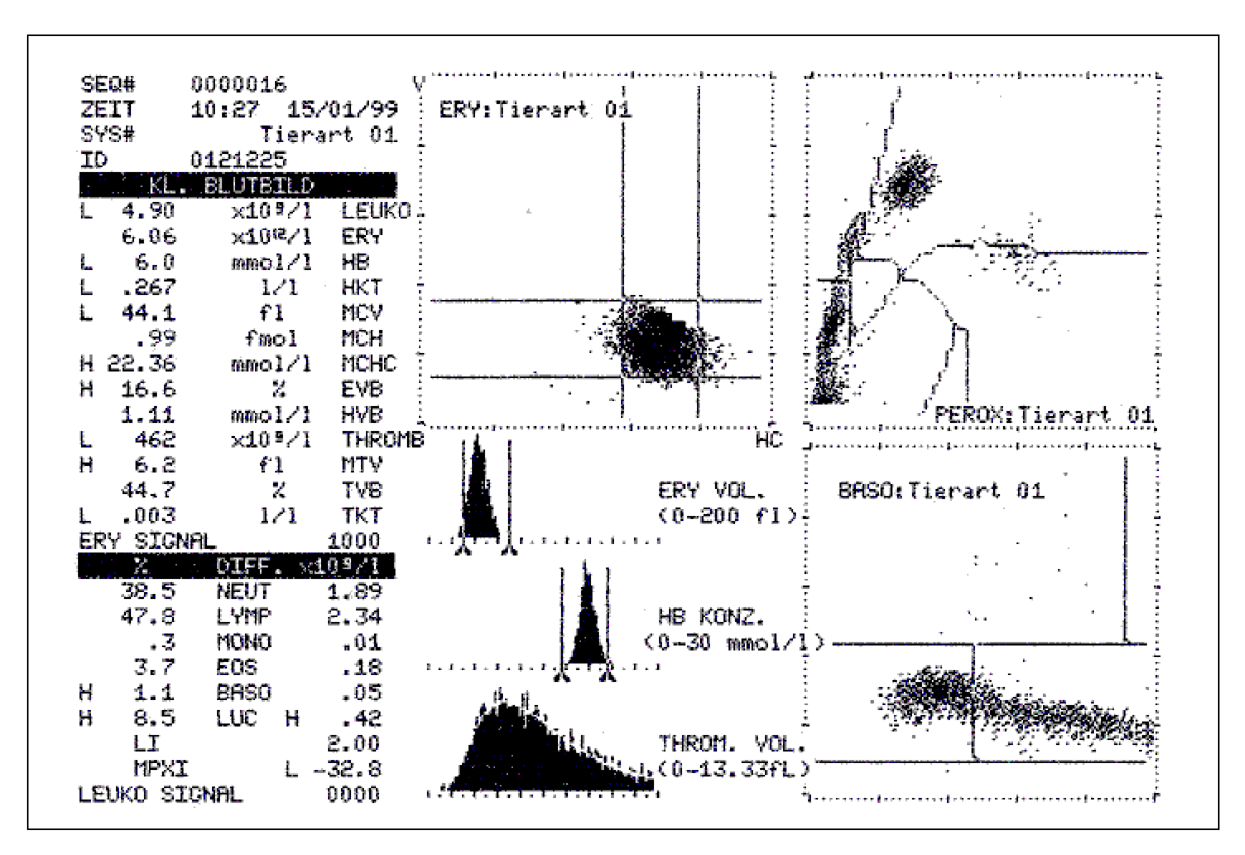


Abb. 16: Report 1 des Technicon H*1 (Rind Nr. 225)

3.1.4 Hämatologiesystem Sysmex F-800

Der Sysmex F-800 ist ein halbautomatisches Hämatologiesystem, das nach dem Prinzip der Widerstandsmessung arbeitet. Mit dem Sysmex F-800 (im weiteren als F-800 bezeichnet) kann ein kleines Blutbild erstellt werden. Gleichzeitig erfolgt eine Größendifferenzierung der Leukozyten.

Zum System gehört die Analyseeinheit und der Autodiluter AD-260 (Fa. TOA Medical Electronics, Hamburg). Zur Aufbereitung der Probe werden 20 µl Blut mit dem Autodiluter angesaugt und 1:500 mit elektrisch leitfähiger Verdünnungslösung Cellpack PK30L (Fa. TOA Medical Electronics, Hamburg) vermischt. Bei Leukozytenzählung und Hämoglobinbestimmung wird zur Zerstörung der Erythrozyten und der Leukozytenzellmembranen 0,1 ml Sysmex-Quicksilver-II zugegeben. Die Erythrozyten- und Thrombozytenzählung erfolgt nach einer

erneuten Verdünnung von 20 µl der ersten Verdünnungsstufe auf ein Verhältnis von 1:50.000.

3.1.4.1 Hämoglobinbestimmung

Das Prinzip der Hämoglobinbestimmung beruht auf einer Modifizierung der international standartisierten Cyanmethämoglobin-Methode. Das Hämoglobin aus den lysierten Erythrozyten wird zu Methämoglobin oxidiert und bildet dann mit dem KCN des Hämolysemittels einen Cyanmethämoglobin-Kompex. Dieser wird bei 540 nm photometrisch bestimmt.

3.1.4.2 Leukozytenbestimmung

Der F-800 gibt neben der Gesamtleukozytenzahl den prozentualen Anteil (W-SCR) und die absolute Anzahl (W-SCC) kleiner Leukozyten sowie den prozentualen Anteil (W-LCR) und die absolute Anzahl (W-LCC) großer Leukozyten an. Die Messung erfolgt an 0,5 ml der 1:500 verdünnten Probe. Die Kerne der Leukozyten werden mit der Widerstandsmessung gezählt und ihr Volumen bestimmt. Das Ergebnis der Zählung und der Volumenmessung wird in einem Histogramm dargestellt. Mit Hilfe von Diskriminatoren (Abbildung 17 Nr. 1/2) kann die Gesamtleukozytenzahl bestimmt und Zellpopulationen von unterschiedlicher Größe voneinander getrennt werden. Abbildung 17 zeigt das WBC Histogramm einer Rinderblutprobe.

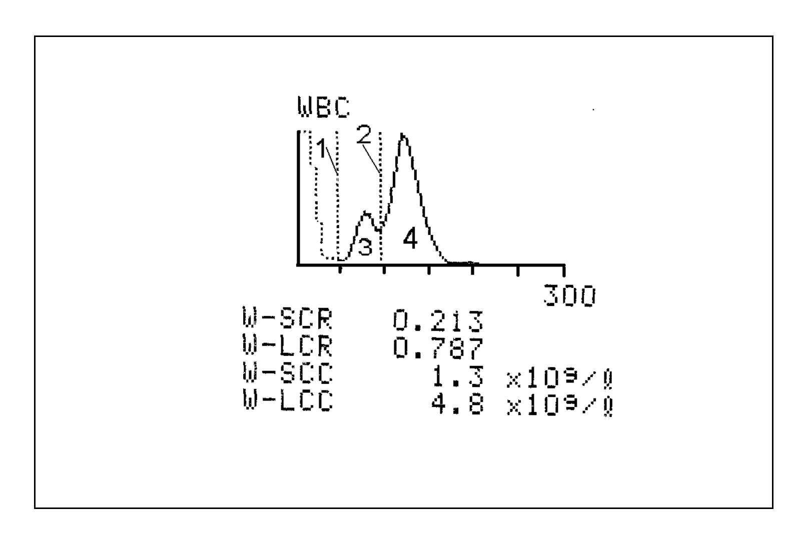


Abb. 17: Sysmex F-800: WBC Histogram, Rind NR. 241

Der im Histogramm mit 1 bezeichnete Diskriminator (Schwellenwert) wird automatisch in einen Bereich zwischen 40 und 60 fl gesetzt und markiert damit den Beginn der Leukozytenpopulation. An der 300 fl Markierung befindet sich ebenfalls ein Diskriminator, der auf Abbildung 17 nicht sichtbar ist. Alle Ereignisse die sich zwischen diesen beiden Diskriminatoren befinden, werden als WBC angegeben.

Der mit 2 bezeichnete Diskriminator (Taldiskriminator) teilt die Leukozyten in zwei Gruppen. Die erste Gruppe setzt sich bei Humanproben laut Herstellerangaben aus Lymphozyten zusammen. Die Zellgruppe oberhalb des Taldiskriminators umfaßt alle Granulozyten und Monozyten. Beide Werte werden absolut und prozentual angegeben.

3.1.4.3 Erythrozyten- und Thrombozytenbestimmung

Die Erythrozyten- und Thrombozytenzahl werden aus der 1:50.000 Verdünnung in einem eigenen Meßkanal bestimmt. Die Signale der Widerstandsmessung werden in je ein Histogramm eingetragen. Der F-800 setzt die Diskriminatoren für das Erythrozyten-Histogramm automatisch zwischen 25–75 fl (unterer Diskriminator) und 200–250 fl (oberer Diskriminator) und für das Thrombozyten-Histogramm zwischen

2–6 fl (unterer Diskriminator) und 6–30 fl (oberer Diskriminator). Bei Proben, die Zellgrößen außerhalb dieser Voreinstellung aufweisen, ist eine manuelle Korrektur der Diskriminatoren möglich. Der Hämatokritwert wird durch die kumulative Impulshöhensummierung berechnet. Hierzu addiert der Automat alle Impulshöhen der Widerstandsmessung und multipliziert das Ergebnis mit einem speziesspezifischen Faktor.
Mittleres Zellvolumen, mittlerer Hämoglobingehalt und mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten werden vom F-800 errechnet. Aus der Untersuchung der Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) wird der Variationskoeffizient angegeben. Die Thrombozytenverteilungsbreite und mittlere Plättchenvolumen werden ebenfalls ausgewiesen.
Abbildung 18 zeigt nun einen vollständigen Ergebnisausdruck des F-800 von Probe Nr. 241.

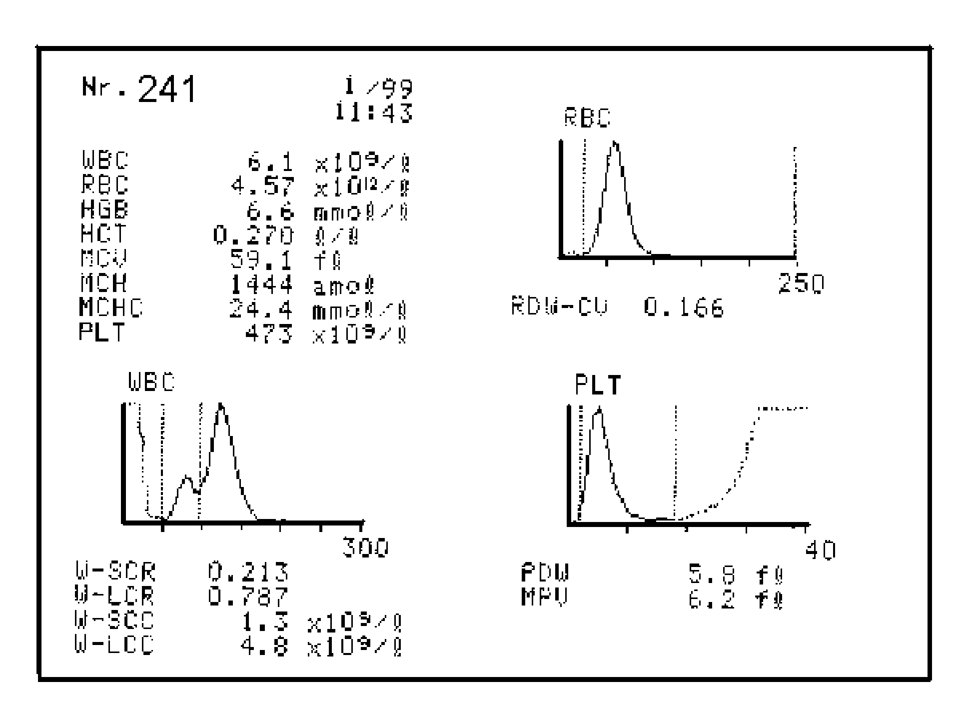


Abb. 18: Sysmex F-800: WBC-Histogramm, Rind Nr. 241

3.1.5 Hämatokritzentrifuge Hämofuge A

Der Hämatokritwert wurde mittels der Mikrohämatokritmethode mit der Hochgeschwindigkeitszentrifuge Hämofuge A (Fa. Heraeus Sepatech GmbH, Osterode) bestimmt (nach DIN 58933). Dazu wurden zwei Kapillarröhrchen zu je 80 % mit Blut gefüllt, an einem Ende verschlossen und 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Durch Anlegen der Kapillarröhrchen an eine Auswertungsschablone kann der Hämatokritwert abgelesen werden. Aus beiden Meßergebnissen wurde der arithmetische Mittelwert gebildet.

3.1.6 Färbungen

Zur Erstellung der manuellen 200er Differentialblutbilder wurden pro Blutrobe je zwei Ausstriche für die panoptische Färbung nach Pappenheim, die α-Naphtylacetat-Esterase-Färbung und die Peroxidase-Färbung angefertigt. Für die 1000er-Erythrozytenzählung zur Bestimmung der Retikulozytenzahl wurden je zwei Ausstriche mittels Brilliantkresylblau angefärbt.

3.1.6.1 Panoptische Färbung nach Pappenheim (PAN)

Die luftgetrockneten Blutausstriche wurden für 5 Minuten mit unverdünnter May-Grünwald-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt und mit Phosphat-Puffer nach Weise (pH 7,2) drei Minuten gespült. Der Ausstrich wurde danach 15 Minuten in verdünnter Giemsa-Lösung (Verdünnung 1:20) inkubiert und zum Abschluß nochmals mit Phosphatpuffer abgespült. Die gefärbten Blutaustriche wurden mit Entellan (Fa. Merck, Darmstadt) und Deckglas eingedeckt.

3.1.6.2 Alpha-Naphtylacetat-Esterase Färbung (ANAE)

Zur Herstellung der α-Naphtylacetat-Esterase Färbung wurde das Färbeset LEUKOGNOST® EST verwendet. Hierzu wurden die luftgetrockneten Blutausstriche mit LEUCOGNOST®-Fixiergemisch eine Minute lang bedeckt und anschließend mit Aqua dest. abgespült. Die so vorbehandelten Blutausstriche wurden in frisch bereitete Färbelösung (aus Testansatz) eingestellt und für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Im Anschluß wurden die Blutausstriche mit Aqua dest. für 10 Sekunden gespült und für 30 Minuten in Mayers Hämalaunlösung nachgefärbt. Die so präparierten Objektträger wurden 5 Minuten unter Leitungswasser gebläut und nach Lufttrocknung zur Konservierung mit AQUATEX® (Fa. Merck Darmstadt) eingedeckt.

3.1.6.3 Peroxidase Färbung (POX)

Die Aufbereitung der Blutausstriche zur Färbung mit dem Färbeset LEUCOGNOST® POX (Fa. Merck, Darmstadt) erfolgte durch Einstellen in LEUCOGNOST®-Fixiergemisch für 1 Minute und anschließendem Spülen mit Leitungswasser. Die fixierten Blutausstriche wurden 10 Minuten mit frisch bereiter Färbelösung (aus Testansatz) bedeckt, mit Aqua dest. 10 Sekunden gespült und luftgetrocknet. Die so vorbehandelten Objekträger wurden dann für zwei Minuten mit Mayers Hämalaunlösung nachgefärbt und abschließend fünf Minuten mit Leitungswasser abgespült. Zur Aufbewahrung wurden die Blutausstriche mit AQUATEX® (Fa. Merck, Darmstadt) und Deckgläschen konserviert.

3.1.6.4 Retikulozytenfärbung

Bei der Supravitalfärbung der Retikulozyten wurden Mikro-Probengefäße zur Retikulozytenfärbung (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Zur Färbung wurden 100 µl Blut mit der im Probengefäß enthaltenen 100 µl Brilliantkresylblaulösung (1 %ig) vermischt und 15 Minuten inkubiert. Aus diesem Ansatz wurde ein Ausstrich angefertigt, der mit Entellan und Deckglas eingedeckt wurde.

3.1.7 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Instituts für Veterinärphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Zur Aufbereitung der Daten wurden das Statistikprogramm BMDP/Dynamic Release 7.0 (DIXON, 1993) eingesetzt. Die graphische Aufbereitung der Daten wurde auf einem Personalcomputer mit dem Programm PlotIT für Windows, Version 3.2 h (EISENSMITH, 1994) erzeugt.

3.1.7.1 Korrelationsanalyse

Bei der Auswertung des Methodenvergleichs wurde der Korrelationskoeffizient r und die Hauptkomponentengerade zur Darstellung des Zusammenhangs der Meßergebnisse berechnet. In der Darstellung werden die Meßwertpaare als Punktwolke und die Hauptkomponentengerade abgebildet. Bei einer vollkommenen Übereinstimmung der Meßwertpaare entspricht $r = 1$ und die Hauptkomponentengerade verläuft deckungsgleich mit der Winkelhalbierenden.

3.1.7.2 Regressionsanalyse

Aus dem Resultat der Regressionsanalyse kann bei Änderung einer Einflußgröße bestimmt werden, wie sich die Ausprägung einer Zielgröße verändert.
Die dabei bestimmte Regressionsgrade ist die Gerade, bei der die Summe der Abstandsquadrate den kleinstmöglichen Wert annimmt (LORENZ, 1996). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt ebenfalls als Punktwolke mit einer Hauptkomponentengerade für die gleichberechtigte Variable. Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet **$y = m x + b$**, bei einer Log-Normalverteilung der Orginaldaten lautet die Formel **$\lg(y) = m \lg(x) + b$**, wobei in beiden Formeln **m** dem

linearen Regressionskoeffezienten entspricht und **b** den Y-Achsenabschnitt bezeichnet.

3.1.7.3 Varianzanalyse

Die Überprüfung der Präzision des ADVIA 120 für die Ergebnisse der Wiederholungsmessung innerhalb einer Serie und über verschiedene Serien hinweg erfolgte mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse. Durch die Bestimmung von Variationskoeffizient (VK) und Standardabweichung (S) ist die Verteilung der Werte um den Mittelwert ($\bar{x}$) zu beurteilen. Abhängig vom Abstand zum Mittelwert wird die Präzision als gut oder schlecht eingestuft. Bei schiefer Verteilung der Orginaldaten wurde eine logarithmische Transformation durchgeführt und der geometrische Mittelwert ($\bar{x}_g$) mit Streufaktor (SF) berechnet.
Die Untersuchungen zur Probenalterung und des Einflusses verschiedener Antikoagulanzien auf die Meßergebnisse wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet.

3.1.7.4 Matched t-Test, Wilcoxon-Test

Die Bestimmung der Signifikanz zwischen den Mittelwerten erfolgte bei normalverteilten Differenzen mittels dem t-Test für verbundene Stichproben und bei nicht normalverteilten Differenzen mittels Wilcoxon-Test.

3.1.7.5 „Klassischer“ $\bar{x} \pm 2s$-Referenzbereich

Die Erstellung eines Referenzbereiches erfolgte üblicherweise durch Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes und der zweifachen Standartabweichung. Voraussetzung für dieses Vorgehen ist eine Normalverteilung der Werte. Durch $\bar{x} \pm 2s$ sollen 95 % gesunde Individuen einer Population erfaßt werden (ACKERMANN, 1983).

3.1.7.5.1 Test auf Normalverteilung

Die Normalverteilung der Daten ist nicht direkt beweisbar. Die Antithese hingegen ist mittels des Shapiro-Wilks-Test beweisbar (Programm BMDP2D). Liegt auf einem Signifikanzniveau von z.B. 5 % keine Normalverteilung bzw. Log-Normalverteilung vor, ist die nicht-parametrische Berechnung der Referenzbereiche die Folge.

3.1.7.5.2 Parametrische Referenzbereiche

Ein parametrischer Referenzbereich zeichnet sich durch den Einsatz der Student- oder t-Verteilung aus. Bei der t-Verteilung ist der Kurvenverlauf ähnlich der Normalverteilung, wobei die Kurve durch die Anzahl der Freiheitsgrade charakterisiert wird. Der Unterschied zur Berechnung des $\bar{x} \pm 2s$ Referenzbereiches liegt im frei wählbaren zu überdeckende Populationsanteil P. Liegt eine Stichprobe zu n quantitativen Werten x_i aus einer Gauß-Verteilung vor, dann überdeckt das Intervall im Mittel den gewünschten Anteil P = 1-α (z.B. 95 %). Folgende Formel kommt dabei zur Anwendung:

$$\bar{x} + t_{1-\alpha/2, n-1} \cdot \sqrt{\frac{n+1}{n}} \cdot s$$

$\bar{x}$ = *arithmetischer Mittelwert*
t = *Wert der Student Verteilung für die zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit α bei n-1 Beobachtungen*
α = *Vorausgewählte zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit*
n = *Anzahl der Beobachtungen*
s = *Standardabweichung*

Der t-Wert ist dabei der statistischen Tabelle der t-Verteilung zu entnehmen (SACHS, 1992).

3.1.7.5.3 Nicht-parametrische Referenzbereiche

Wird für einen Parameter festgestellt, daß keine Normalverteilung vorliegt, werden nicht-parametrische Referenzbereiche oder Quantile berechnet. Dazu rangordnet man alle Werte x_i eines Stichprobenumfangs n zu einer Wertereihe $x_{(i)}$ in auf- oder absteigender Folge. Die Berechnung der Meßbereichsgrenzen erfolgt mit der Formel:

$$\left[x_{((\alpha/2)\cdot(n+1))} \quad ; \quad x_{((1-\alpha/2)\cdot(n+1))} \right]$$

x = untere bzw. obere Grenze des Referenzbereiches
α = vorausgewählte zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit
n = Anzahl der Beobachtungen

Durch die Bestimmung von α kann der Anteil der Grundgesamtheit bestimmt werden.

3.1.8 Altersabhängigkeit der Referenzbereiche

Der Einfuß des Alters auf einen Parameter kann dazu führen, daß die Angabe eines globalen Referenzbereiches zu einem bestimmten Lebensalter zu weite oder falsche Referenzbereiche liefert. Eine Einteilung in Altersgruppen erscheint daher sinnvoll. Der Nachteil dieser Einteilung ist die willkürliche Gruppenbildung, die unter Umständen sehr viele Einzelwerte zur Folge hat.

In dieser Arbeit wurden die Daten mittels einer nicht-parametrischen Regression mit einem lokal gewichteten Regressionsglätter (S-Plus Version 3.1, Statistical Sciences, Inc.) aufbereitet und in drei Altersgruppen eingeteilt. Abbildung 19 zeigt das Diagramm für den MCV. Dabei lassen sich die drei Altersgruppen erkennen, die Aufgrund eines Einschnitts im Kurvenverlauf, einzeln behandelt werden.

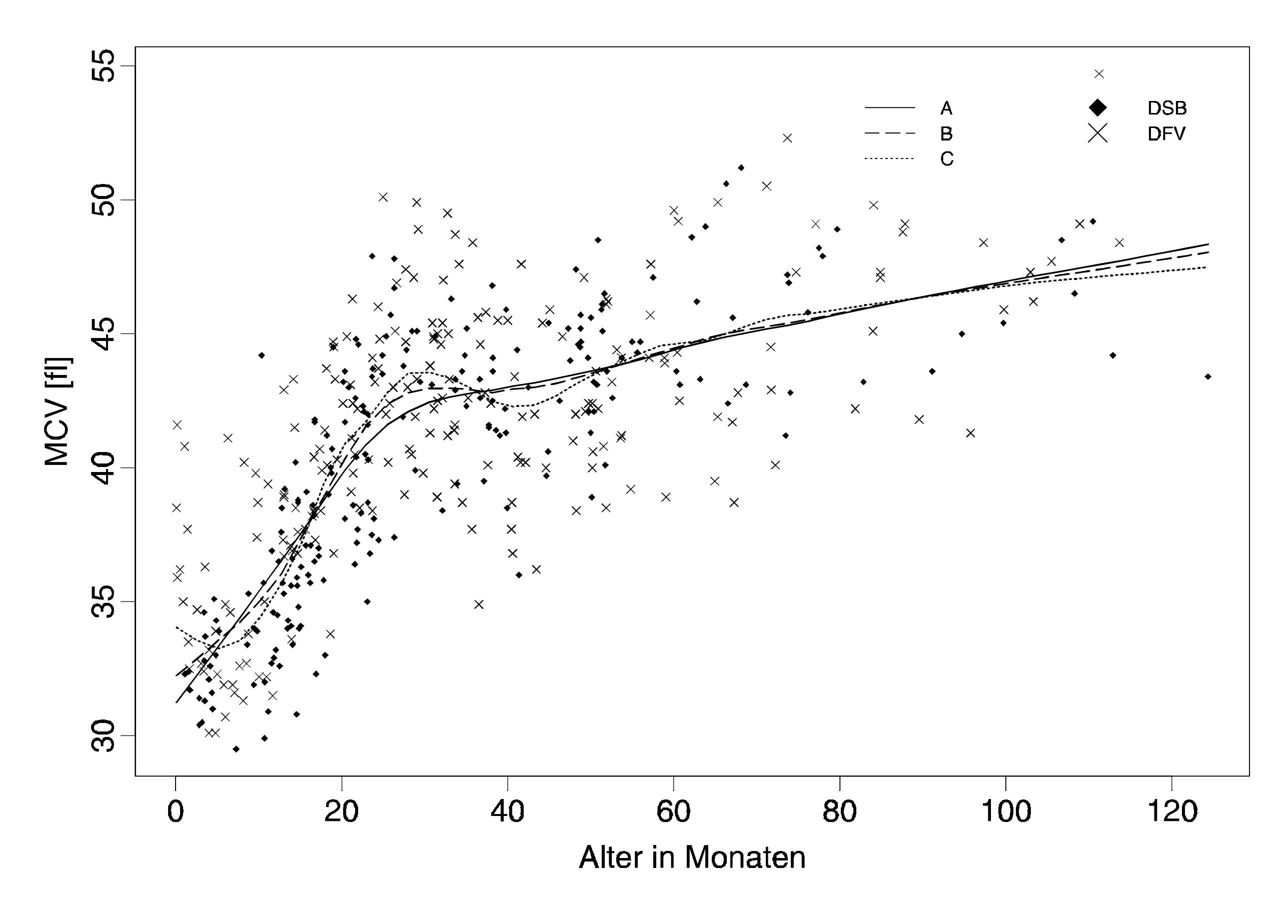


Abb. 19: Nicht parametrische Regression des mittleren Erythrozytenvolumens.

Die Linien A; B, C stellen sind unterschiedliche Glättungen der Werte dar. Für die Kurve A wurden die Werte mit einem „Span“ von 0,6 am stärksten geglättet, B: 0,4 und C: 0,2.

Da der überwiegende Anteil der behandelten Parameter diese Einschnitte zeigte, ist die Einteilung in Tiere bis 6 Monate, Tiere 6-24 Monate und Tiere älter als 24 Monate für alle Parameter übernommen worden. Bei einigen Ausnahmen ist auf die Unterteilung der Gruppe kleiner 24 Monate verzichtet worden. Für jede dieser Gruppen wurden Formeln zur Berechnung eines parametrischen altersabhängigen Referenzbereiches ermittelt.

BEDDIES (1999) gibt für die Berechnung altersabhängiger Referenzbereiche bei Schafen folgende Formel an:

$$y(x) = a + b \cdot x \pm t_{1-\alpha/2, n-3} \cdot \sqrt{\frac{n+1}{n}} \cdot s$$

a = Y- Achsenabschnitt der Regressionsgeraden
b = Steigung der Regressionsgeraden
x = Altersangabe in Monaten
t = Wert der Student Verteilung für die zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit α bei n-3 Beobachtungen
α = vorausgewählte zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit
n = Anzahl der Beobachtungen
s = Standardabweichung

Die Formel stellt eine Modifikation der Formel von ACKERMANN (1983) dar. Die Berechnung erfolgt dabei mit der Formel für parametrische Referenzbereiche, wobei $\bar{x}$ durch die Gleichung der Regressionsgraden ersetzt wird.

3.1.9 Rassenabhängigkeit der Referenzbereiche

Der Einfluß der Rasse auf die Referenzbereiche wird mit Hilfe des Programms BMDP1V getestet. Die Probanden werden in die oben beschriebenen Altersgruppen eingeteilt und einer Kovarianzanalyse unterzogen. Dabei wird einerseits überprüft, ob die Regressionsgraden der Rassen parallel verlaufen, andererseits kann ermittelt werden, ob eine globale Altersabhängigkeit besteht.
Wenn beide Voraussetzungen gegeben sind, wird mit Hilfe vom „Alter bereinigter" Mittelwerte für jeden Parameter ein rassenabhängiger Mittelwert und ein oberer und unterer Grenzwert berechnet.

3.1.10 Softwareadaptation und begleitende Evaluation des ADVIA 120.

Die Softwareversion 1 des Hämatologiesystems ADVIA 120 wurde aus humanmedizinischen Einstellungen durch Dr. David Zelmanovic von der Fa. Bayer für das Rind anhand von 10 Blutproben am 25.05.98 in Gießen eingestellt. Danach erfolgte die sogenannte Alpha-site über fünf Monate anhand von 115 Blutproben. Aus diesen Daten des ADVIA 120 und der Referenzmethoden wurde die Softwareversion 2 erstellt. Die Einstellungen der Softwareversion 3 erfolgte mit weiteren 30 Blutproben von gesunden und von kranken Rindern und wurde am 06.11.98 freigegeben. Weitere 60 Blutproben wurden zur Erstellung der Softwareversion 4 bearbeitet. Diese Softwareversion wurde am 15.12.98 zur Überprüfung freigegeben und als vorläufige Endversion für die Spezies-einstellungen mit abschließenden 30 Proben getestet. In Tabelle 15 sind die einzelnen Schritte der Softwareadaptation und der Evaluation zusammengestellt.

Tab. 15: Stationen der Softwareadaptation mit begleitender Evaluation ADVIA 120 für die Speziessoftware Rind.

Software-version	Datum der Freigabe	Probenzahl
V.1.012OC	11.03.98	115
V.1.1.01-MS	06.10.98	30
V.1.1.03-MS	06.11.98	60
V.1.1.04-MS	15.12.98	30

3.2 ERGEBNISSE

3.2.1 Evaluation des ADVIA 120

3.2.1.1 Methodenvergleich

Die Richtigkeit der Meßergebnisse ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Einsatzfähigkeit eines Hämatologiesystems. Dazu wurden Blutproben von 245 Rindern mittels etablierter Referenzmethoden untersucht und den Ergebnissen des ADVIA 120 gegenübergestellt. Für die Parameter der Blutzellzählung diente der H*1, der Sysmex F-800 und die Hämatokritzentrifuge als Referenzgerät. Zur Überprüfung der Richtigkeit der Blutzelldifferenzierung wurden die Resultate des ADVIA 120 mit denen der manuellen Differenzierung (200er Differentialblutbild der Färbungen POX, ANAE und PAN) gegenübergestellt. Die Richtigkeit der Ergebnisse der Retikulozytenzählung erfolgte mittels der Supravitalfärbung mit Brillantkresylblau (1000 gezählte Zellen).
In den folgenden zwei Kapiteln sind die Ergebnisse der einzelnen Softwareversionen für die Parameter der Blutzellzählung und Blutzelldifferenzierung unter Angabe des Korrelationskoeffizienten „r" und der Hauptkomponentengleichung $y = m x + b$ (logarithmierte Werte: $\lg (y) = m \lg (x) + b$) sowie das Resultat des Matched t-Test / Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben dargestellt.

3.2.1.2 Richtigkeit der Blutzellzählung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Methodenvergleichs für die Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, MCV und MCH dargestellt. Verglichen wurde der ADVIA 120 mit dem Technicon H*1, dem Sysmex F-800 und der Hämatokritzentrifuge. In der Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Korrelation des ADVIA 120 mit dem Technicon H*1 ersichtlich.

Tab. 16: Korrelation der Parameter der Blutzellzählung des ADVIA 120 mit denen des H*1; Korrelationskoeffizient = r; Hauptkomponentengleichung: **y = mx + b** (logarithmierte Werte **lg(y) = lg(mx + b)** Signifikanz für alle Parameter $p \leq 0,001$.

Parameter/ Einheit	**ADVIA 120 / H*1** Softwareversionen 1 - 4, Korrelationskoeffizient r Hauptkomponentengleichung y = mx + b				
		Version1 n = 115	**Version2** n = 30	**Version3** n = 60	**Version4** n = 30
WBC [l] G/l	**r**	0,989	0,985	0,990	0,997
	y	1,03x-0,10	1,03x-0,13	1,01x-0,04	1,01x-0,06
RBC T/l	**r**	0,991	0,998	0,992	0,993
	y	0,94x-0,002	1,003x+0,15	1,02x-0,25	0,96x-0,05
HGB mmol/l	**r**	0,982	0,990	0,990	0,996
	y	1,003x-0,23	1,09x-0,37	0,95x+0,25	0,92x+0,21
HCT l/l	**r**	0,987	0,985	0,986	0,995
	y	1,01x-0,01	0,98x+0,02	1,0x-0,01	1,03x-0,01
MCV fl	**r**	0,991	0,994	0,997	0,999
	Y	1,06x-0,92	0,95x+4,02	1,09x-2,5	0,98x+2,04
MCH fmol	**r**	0,976	0,994	0,994	0,992
	Y	1,09x-0,07	1,07x-0,01	0,99x+0,02	0,96x+0,03
MCHC mmol/l	**r**	0,468	0,768	0,859	0,867
	Y	1,48x-11,34	0,61x+8,56	0,71x+6,19	1,04x-1,25
PLT [l] G/l	**r**	0,964	0,987	0,971	0,990
	y	1,01x-0,03	0,98x+0,04	0,96x+0,09	1,04x-0,16
MPV fl	**r**	0,048*	0,254*	0,647	0,145*
	y	0,13x+4,97	0,94x+0,15	1,70x-4,31	0,83x+0,29

*n.s., **p < 0,05, ***p < 0,01, [l] logarithmierte Werte

Abbildung 20 zeigt ein Beispiel einer sehr guten Übereinstimmung der mit beiden Methoden erzielten Ergebnisse, die Daten des ADVIA 120 (Softwareversion 4) für den RBC im Vergleich zu den Werten des H*1.



Abb. 20:
Korrelationsdiagramm
RBC (T/l)

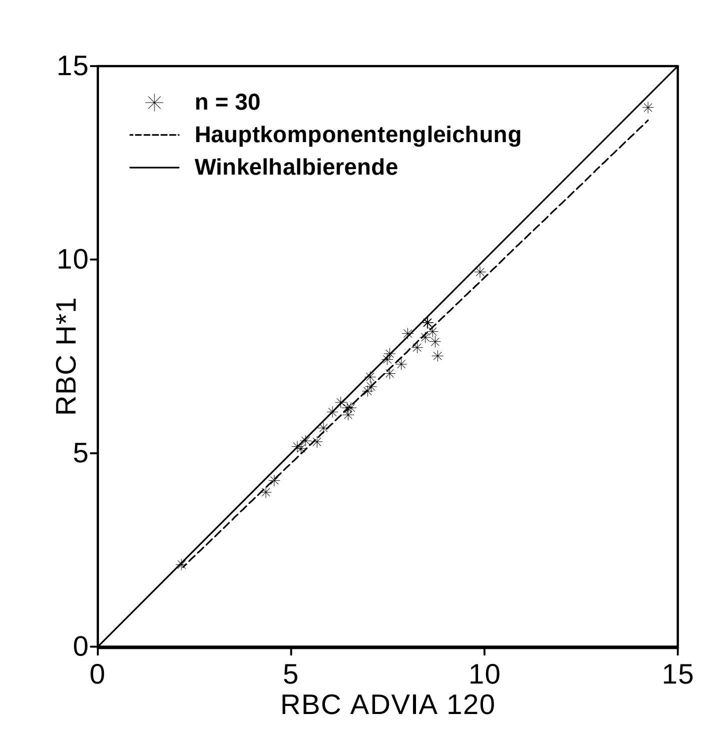
Referenzgerät: **H*1**

Softwareversion: 4

Y = 0,96x-0,05

r = 0,993

p < 0,001



In der Tabelle 17 werden die Daten der Korrelation für den Vergleich von ADVIA 120 mit dem Impedanzmesssystem Sysmex F-800 vorgestellt

Tab. 17: Korrelation des ADVIA 120 mit dem Sysmex F800 für die Parameter der Blutzellzählung; Korrelationskoeffizient = r; Hauptkomponenten-gleichung: **y = mx + b** (logarithmierte Werte lg(y) = lg(mx + b)), Signifikanz für alle Parameter p ≤ 0,001

Parameter / Einheit	ADVIA 120 / Sysmex F800 Softwareversionen 1 - 4, Korrelationskoeffizient r, Hauptkomponentengleichung y = mx + b				
		Version 1 n=115	**Version 2** n=30	**Version 3** n=60	**Version 4** n=30
WBC [l] G/l	**r**	0,969	0,947	0,980	0,997
	y	1,05x-0,08	0,94x+0,04	0,97x+0,01	0,97x+0,01
RBC T/l	**r**	0,977	0,959	0,973	0,974
	y	0,95x-0,21	1,10x-1,16	0,97x-0,2	1,00x-0,46
HGB mmol/l	**r**	0,985	0,987	0,992	0,995
	y	1,02x-0,07	1,11x-0,17	1,0x+0,14	0,99x+0,10
HCT l/l	**r**	0,948	0,893	0,920	0,946
	y	1,15x-0,03	1,16x-0,01	1,1 1x-0,0	1,02x+0,01
MCV fl	**r**	0,987	0,977	0,983	0,980
	Y	1,06x+3,3	0,97x+7,87	1,15x-1,06	1,08x+3,63
MCH fmol	**r**	0,961	0,919	0,958	0,869
	Y	1,12x-0,02	1,24x-0,09	1,18x-0,08	1,41x-0,29
MCHC mmol/l	**r**	0,184*	0,042*	0,612	0,427***
	Y	6,58x-130,8	0,12x+18,92	1,7x-17,7	1,44x-11,99
PLT [l] G/l	**r**	0,671	0,940	0,788	0,963
	y	1,18x-0,54	1,24x-0,68	0,77x+0,56	1,29x-0,95
MPV fl	**r**	0,471	0,221	0,750	0,581**
	y	0,32x+4,55	0,23x+5,43	1,16x-0,38	0,38x+4,29

*n.s., **p < 0,05, ***p < 0,01, [l] logarithmierte Werte

Im Vergleich zu Abbildung 20 kann der Abbildung 21 entnommen werden, daß mit dem ADVIA 120 auch gegenüber der Impedanzmessung eine sehr gute Übereinstimmung erzielt wird.

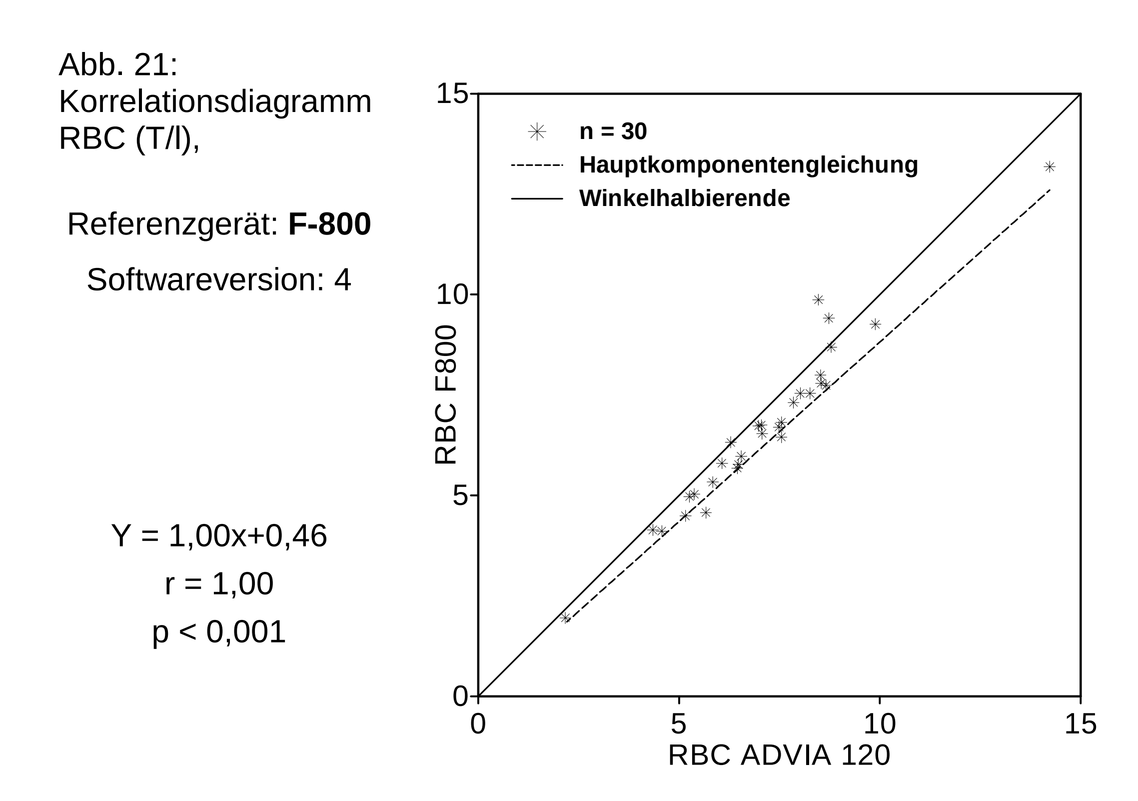


Abb. 21: Korrelationsdiagramm RBC (T/l),

Referenzgerät: **F-800**

Softwareversion: 4

Y = 1,00x+0,46

r = 1,00

p < 0,001

Abbildung 21 zeigt die graphische Darstellung der Thrombozytenzählung (Softwareversion 1) als Beispiel für eine mittlere Korrelation (r = 0,671).

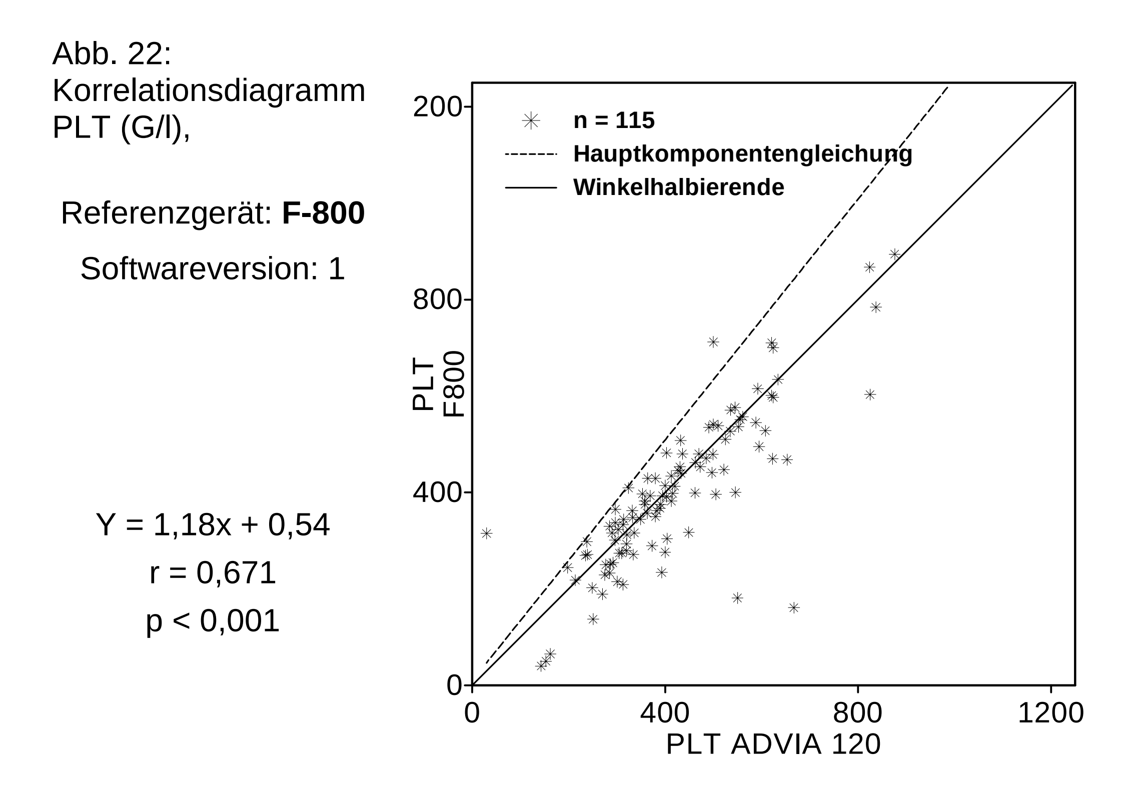


Abb. 22:
Korrelationsdiagramm
PLT (G/l),

Referenzgerät: **F-800**

Softwareversion: 1

Y = 1,18x + 0,54
r = 0,671
p < 0,001

Der Tabelle 18 können die Ergebnisse für den Vergleich ADVIA 120 und der Mikrohämatokritmethode für den Hämatokritwert entnommen werden.

Tab. 18: Korrelation des ADVIA 120 mit den Ergebnissen der Mikrohämatokrit-methode; Korrelationskoeffizient = r; Hauptkomponentengleichung **y = mx + b**, Signifikanz für alle Parameter p ≤ 0,001

Parameter / Einheit		**ADVIA 120 / Zentrifuge** Softwareversionen 1 - 4, Korrelationskoeffizient r, Hauptkomponentengleichung y = mx + b			
		Version1 n=111	**Version2** n=30	**Version3** n=63	**Version4** n=30
HCT l/l	**r**	0,913	0,918	0,955	0,975
	y	0,95x+0,03	0,94x+0,05	1,09x+0,0	1,05x+0,02

*n.s., **p < 0,05, ***p<0,01, [l] logarithmierte Werte

Für die untersuchten Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, MCV und MCH ist die Korrelation sowohl mit den Ergebnissen des H*1 als auch mit den Ergebnissen des F-800 sowie der Zentrifuge über alle Versionen als sehr gut zu bewerten (Korrelationskoeffizient: $r \leq 0,9$; Signifikanzniveau: $p < 0,001$).
Die Korrelation der Ergebnisse des ADVIA 120 mit denen des H*1 ist für die Thrombozytenzählung (PLT) mit $r > 0,9$ ebenfalls als sehr gut zu bezeichnen. Dagegen liefert der Methodenvergleich mit dem F-800 in Version 1 und 3 deutlich schlechtere Ergebnisse ($r < 0,78$). Die Richtigkeit der MPV Messung ist im Vergleich zu den beiden gewählten Referenzmethoden als schlecht zu bezeichnen, wobei die Ergebnisse des ADVIA 120 mit den Messungen des F-800 besser korrelieren als mit denen des Technicon H*1.
Für die Ergebnisse der Retikulozytenzählung kann keine Korrelation angegeben werden, da aufgrund erheblicher Unterschiede in der Sensitivität der Methoden ein verzerrtes Ergebnis dargestellt würde. Der ADVIA 120 unterscheidet bei der Zählung der Retikulozyten drei unterschiedliche Reifestadien.
Zellen mit einem hohem Gehalt an RNA (H Retic) entsprechen den mikroskopisch erkennbaren und somit zählbaren Retikulozyten. Der Anteil dieser Retikulozyten im Blut von Rindern ist nach STÖBER u. GRÜNDER (1991) kleiner 1‰. Ein Vergleich der Ergebnisse des ADVIA 120 mit denen der manuellen Zählung kann aus diesen Gründen kein valides Resultat erbringen.

3.2.1.3 Richtigkeit Blutzelldifferenzierung

Bei der Blutzelldifferenzierung wurden als Referenzmethoden die Panoptische Färbung nach Pappenheim, die Peroxidase Färbung und die α-Naphtylacetat-Esterase Färbung eingesetzt. Von jedem Ausstrich wurden 200 Zellen manuell differnziert und den Ergebnissen des ADVIA 120 gegenübergestellt. Verglichen wurden die prozentualen Anteile der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten und Monozyten an der Gesamt-Leukozytenzahl. In den Tabellen19, 20 und 21 sind die Ergebnisse nach den Färbungen gegliedert wiedergegeben. Dabei wird für jede Softwareversion (vgl. Kapitel 3.1.10) eine eigene Korrelation angegeben.

Tab. 19: Korrelation der Werte des ADVIA 120 mit denen der Panoptischen Färbung (PAN) für die Parameter der Blutzelldifferenzierung vergleichend für alle Softwareversionen: Korrelationskoeffizient = r, Hauptkomponentengleichung **y = mx + b**; (logarithmierte Werte lg(y) = lg(mx + b); Signifikanz für alle Parameter p ≤ 0,001

Parameter/ Einheit	**ADVIA 120 / Panoptische Färbung** Softwareversionen 1 - 4, Korrelationskoeffizient r Hauptkomponentengleichung y = mx + b				
		Version1 n = 110	**Version2** n = 30	**Version3** n = 62	**Version4** n = 29
Neutrophile G. %	**r**	0,838	0,925	0,573	0,945
	y	1,25x-3,86	1,19x-0,66	1,44x-9,40	1,03x+3,51
Lymphozyten [l] %	**r**	0,833	0,932	0,550	0,895
	y	1,33x-0,60	1,26x-0,48	1,59x-1,06	1,09x-0,16
Monozyten [l] %	**r**	0,289**	0,151*	0,276**	0,395**
	y	4,31x-2,82	6,62x-3,9	2,13x-0,74**	1,57x-0,39
Eosinophile G. [l] %	**r**	0,845	0,906	0,716	0,798
	y	1,24x-0,12	1,22x-0,15	1,28x-0,22	1,53x-0,39
Basophile G. [l] %	**r**	0,062*	0,221*	0,113*	0,152*
	y	0,08x+0,55	4,17x-0,16	0,09x+0,57	9,20x+0,16

*n.s.,** p < 0,05, [l] logarithmierte Werte

Tab. 20: Korrelation der Werte des ADVIA 120 mit denen der zytochemischen Färbung POX für die Parameter der Blutzelldifferenzierung vergleichend für alle Softwareversionen; r = Korrelationskoeffizient; Hauptkomponentengleichung y = mx + b (logarithmierte Werte lg(y) = lg(m x + b)), Signifikanz für alle Parameter $p \leq 0{,}001$

Parameter / Einheit	**ADVIA 120 / Peroxidasefärbung** Softwareversionen 1 - 4, Korrelationskoeffizient r Hauptkomponentengleichung y = mx + b				
		Version1 n = 14	**Version2** n = 30	**Version3** n = 63	**Version4** n = 30
Neutrophile G. %	**r**	0,915	0,845	0,673	0,925
	y	1,19x-0,17	1,31x-2,58	1,34x-2,96	1,08x+2,51
Lymphozyten [l] %	**r**	0,974	0,859	0,550	0,916
	y	1,18x-0,31	1,21x-0,38	1,59x-1,06	1,13x-0,22
Monozyten [l] %	**r**	0,054*	0,288*	0,199*	0,410**
	y	43,59x-39,22	5,22x-3,17	10,41x-6,88*	4,22x-2,91
Eosinophile G. [l] %	**r**	0,922	0,694	0,670	0,770
	y	1,31x-0,35	1,56x-0,66	1,51x-0,79	1,74x-0,53
Basophile G. [l] %	**r**	-	-	-	-
	y	-	-	-	-

*n.s.,** p < 0,05, [l] logarithmierte Werte

Tab. 21: Korrelation der Werte des ADVIA 120 mit denen der zytochemischen Färbung ANAE für die Parameter der Blutzelldifferenzierung vergleichend für alle Softwareversionen; r = Korrelationskoeffizient, Hauptkomponentengleichung y = mx + b (logarithmierte Werte lg(y) = lg(mx + b)), Signifikanz aller Parameter $p \leq 0{,}001$

Parameter / Einheit	**ADVIA 120 / α-Naphtylesterasefärbung** Softwareversionen 1 - 4, Korrelationskoeffizient r Hauptkomponentengleichung y = mx + b				
		Version1 n = 102	**Version2** n = 30	**Version3** n = 63	**Version4** n = 30
Neutrophile G. %	**r**	0,745	0,845	0,814	0,962
	Y	1,28x-0,50	1,31x-2,58	1,21x-0,70	1,02x+4,74
Lymphozyten [l] %	**r**	0,776	0,859	0,802	0,938
	y	1,53x-0,94	1,21x-0,38	1,21x-0,40	1,02x-0,07
Monozyten [l] %	**r**	0,134*	0,288*	0,511	0,509**
	y	12,04x-8,94	5,22x-3,17	1,95x-,60	3,12x-1,76
Eosinophile G. [l] %	**r**	0,156	0,694	0,683	0,657
	y	5,0x-2,6	1,56x-0,66	1,34x-0,68	1,41x-0,50
Basophile G. [l] %	**r**	—	—	—	—
	y	—	—	—	—

*n.s.,** p < 0,05, [l] logarithmierte Werte

Die manuell ermittelten prozentualen Anteile neutrophiler Granulozyten am Blutbild korrelieren bei allen drei Färbungen gut bis sehr gut mit den Messungen des ADVIA 120. Eine Ausnahme bildet hier das Ergebnis der Softwareversion 3 für die Peroxidase- (r = 0,673) und Panoptische- (r = 0,573) Färbung. Die ANAE-Färbung ergab insgesamt die schlechteste Korrelation über alle vier Versionen. Bei der

Differenzierung der Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten korrelieren die Resultate des ADVIA 120 gut mit denen der mikroskopischen Differenzierung. Die geringsten Korrelationen ergaben sich hinsichtlich der Monozytendifferenzierung, und dies in allen vier Softwareversionen sowie bei allen Färbungen. Die Identifikation der basophilen Granulozyten stellte sich bei der manuellen Differenzierung aufgrund der geringen Anzahl im Blut als sehr schwierig dar, so daß eine Korrelation der Ergebnisse nur für die PAN-Färbung vollständigkeitshalber erstellt wurde.

3.2.2 Präzision

Die Präzision des ADVIA 120 wurde auf zwei Arten bestimmt. Einerseits wurde eine Blutprobe von einem Probanden 25mal in Folge gemessen, um die Präzision bei gleicher Einstellung des Gerätes innerhalb einer Serie zu ermitteln. Andererseits wurde jede der 245 Evaluationsblutproben dreifach gemessen und aus diesen Werten die Präzision von Serie zu Serie bestimmt. Dabei wurde der Einfluß durch Ein- und Abschalten des Gerätes, von durchgeführten Kalibrationen und der Umwelteinfluß auf das System über einen Zeitraum von mehreren Monaten beurteilt. Aus diesen Messungen wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variations-koeffizient berechnet.
In den folgenden zwei Tabellen werden die Resultate der Präzisionsmessungen getrennt nach Blutzellzählung und Blutzelldifferenzierung dargestellt.

In der Tabelle 22 ist die Präzision der Blutzellzählung innerhalb der Serie in der rechten Spalte (fettgedruckt) für die Softwareversion 4 dargestellt und die Präzision über verschiedene Serien hinweg für die Softwareversionen 1-4 (vgl. Kapitel 3.1.10) in die vorherigen Spalten eingefügt. Es erfolgt die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung sowie des Variationskoeffizienten für die Parameter WBC, RBC, RDW, HGB, HDW, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, MPV, PDW, MPC, Retic. Aus technischen Gründen fehlen die Angaben für die Präzision innerhalb der Serie für die Parameter HDW, MPC und Retic %.

Tab. 22: Präzision der Blutzellzählung über verschiedene Serien hinweg und innerhalb einer Serie (25-fach-Messung, n = 1); $\bar{x}$ ± SD_{in} = Mittelwert ± Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient

Parameter / Einheit		ADVIA 120 Softwareversionen 1 - 4, **Präzision über verschiedene Serien hinweg bei Dreifachmessung**				**ADVIA 120 Präzision innerhalb der Serie (25-fach-Messung)**
		Version 1 n = 115	Version 2 n = 30	Version 3 n = 60	Version 4 n = 30	Version 4 n = 1
WBC[l] G/l	$\bar{x}$ ± SD	8,98 ± 2,57	9,41 ± 2,31	8,49 ± 2,79	9,93 ± 6,26	**6,75 ± 0,15**
	CV	3,84 %	2,00 %	2,69 %	2,26 %	**2,20 %**
RBC T/l	$\bar{x}$ ± SD	7,02 ± 1,20	8,41 ± 1,54	7,44 ± 1,54	7,16 ± 2,10	**5,62 ± 0,07**
	CV	1,45 %	1,44 %	1,76 %	1,11 %	**1,20 %**
RDW%	$\bar{x}$ ± SD	18,62 ± 1,75	20,98 ± 2,14	20,21 ± 1,91	21,71 ± 5,84	**16,68 ± 0,12**
	CV	0,91 %	0,84 %	0,76 %	0,59 %	**0,08 %**
HGB mmol/l	$\bar{x}$ ± SD	6,93 ± 0,87	6,97 ± 1,04	6,77 ± 1,22	5,92 ± 1,44	**6,89 ± 0,10**
	CV	1,06 %	1,21 %	1,63 %	1,19 %	**1,40 %**
HDW %	$\bar{x}$ ± SD	1,20 ± 0,11	1,57 ± 0,16	1,52 ± 0,22	1,60 ± 0,34	**n.b.**
	CV	0,82 %	0,78 %	0,88 %	0,78 %	
HCT l/l	$\bar{x}$ ± SD	0,30 ± 0,04	0,31 ± 0,05	0,29 ± 0,05	0,26 ± 0,06	**0,28 ± 0,003**
	CV	1,14 %	1,76 %	1,87 %	1,16 %	**1,30 %**
MCV fl	$\bar{x}$ ± SD	42,99 ± 5,21	37,52 ± 6,47	39,84 ± 5,41	37,34 ± 8,30	**50,65 ± 0,46**
	CV	0,54 %	0,44 %	0,47 %	0,37 %	**0,90 %**
MCH fmol	$\bar{x}$ ± SD	1,00 ± 0,11	0,84 ± 0,13	0,93 ± 0,15	0,86 ± 0,19	**1,22 ± 0,02**
	CV	1,12 %	1,94 %	1,56 %	1,35 %	**1,40 %**
MCHC mmol/l	$\bar{x}$ ± SD	23,27 ± 0,51	22,58 ± 1,11	23,18 ± 1,02	22,88 ± 1,43	**24,18 ± 0,39**
	CV	0,98 %	1,91 %	1,55 %	1,30 %	**1,60 %**

n.b.: nicht bestimmt, [l] logarithmierte Werte

Fortsetzung Tab. 22:

Parameter / Einheit		ADVIA 120 Softwareversionen 1 - 4, **Präzision über verschiedene Serien hinweg bei Dreifachmessung**				**ADVIA 120 Präzision innerhalb der Serie (25-fach-Messung)**
		Version1 n = 115	Version2 n = 30	Version3 n = 60	Version4 n = 30	**Version4 n = 1**
PLT [l] G/l	$\bar{x}$ ± SD	416,7 ± 159,4	415,5 ± 198,7	524,1 ± 287,6	647,1 ± 214,8	**633,5 ± 34,9**
	CV	6,22 %	4,15 %	6,78 %	3,60 %	**5,50 %**
MPV fl	$\bar{x}$ ± SD	7,20 ± 0,80	5,94 ± 0,61	6,15 ± 0,64	6,14 ± 0,76	**5,94 ± 0,09**
	CV	3,26 %	3,31 %	1,70 %	3,67 %	**1,50 %**
PDW %	$\bar{x}$ ± SD	52,80 ± 12,68	38,44 ± 10,18	51,54 ± 3,75	61,74 ± 9,28	**47,99 ± 2,30**
	CV	11,90 %	12,14 %	3,03 %	6,78 %	**4,79 %**
MPC g/dl	$\bar{x}$ ± SD	23,41 ± 1,76	25,39 ± 2,19	26,04 ± 1,73	24,60 ±1,65	**n.b.**
	CV	1,34 %	1,15 %	1,33 %	1,34 %	
Retic %	$\bar{x}$ ± SD	0,10 ± 0,05	0,08 ± 0,08	0,20 ± 0,40	0,31 ± 0,58	**n.b.**
	CV	29,73 %	50,59 %	47,70 %	37,87 %	
Retic [l] G/l	$\bar{x}$ ± SD	5,29 ± 4,44	5,15 ± 4,95	14,41 ± 33,76	17,28 ± 23,15	**1,98 ± 1,21**
	CV	33,84 %	56,70 %	60,26 %	49,30 %	**61,20 %**

n.b.: nicht bestimmt, [l] logarithmierte Werte

Wie in Tabelle 22 ersichtlich, ist die Wiederholbarkeit der Ergebnisse für die Leukozytenzählung über verschiedene Serien hinweg bis auf Version 1 sehr gut (CV < 2,69). Die Präzision innerhalb einer Serie ist mit einem CV von 2,20 % ebenfalls sehr gut.

Für die Erythrozytenzählung, Hämoglobinbestimmung und den Hämatokritwert sowie für die Indizes des roten Blutbildes verfügt das Gerät mit einem Variationskoeffizient von unter zwei Prozent ebenfalls über eine sehr gute Wiederholbarkeit der Ergebnisse. Dies gilt sowohl für die Präzision über verschiedene Serien hinweg, als auch für die 25-fach-Messung einer Probe.

Bei der Thrombozytenzählung liegt der Variationskoeffizient für die Parameter PLT, MPV und PDW bei beiden Untersuchungen zwischen 3,3 % und 6,8 %. Positive

Ausnahme ist hier das MPV bei der Präzision innerhalb der Serie (CV 1,5 %), ein negativer Ausreißer ist die PDW in Version 1 und 2 bei der Präzision von Serie zu Serie (CV = 11,9 %, 12,1 %). Eine sehr gute Wiederholbarkeit liegt für den MPC (CV < 1,4%) von Serie zu Serie in allen vier Versionen vor.
Die Retikulozytenzählung ist in beiden Untersuchungen durch eine schlechte Wiederholbarkeit gekennzeichnet. Der Variationskoeffizient liegt hier zwischen 62 % und 33 %. Die Bestimmung des prozentualen Anteils an der Erythrozytenpopulation zeigt nur eine geringfügig bessere Präzision über verschiedene Serien hinweg.

Die Ergebnisse der Blutzelldifferenzierung können der Tabelle 23 entnommen werden. Hier erfolgte eine Bestimmung der Präzision mittels Variationskoeffizient und Mittelwert mit Standardabweichung für die Zellgruppen der neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie für Lymphozyten, Monozyten und der Gruppe der large unstained cells (LUC). Berücksichtigt wurde sowohl der prozentuale Anteil der Zellen an der Gesamt-Leukozytenzahl sowie die absoluten Ergebnisse in G/l.

Auf den folgenden Seiten sind die Tabellen für die Blutzelldifferenzierung, synoptisch für die Präzision über verschiedene Serien hinweg für die Softwareversionen 1-4 und für die Präzision innerhalb der Serie (Softwareversion 4, vgl. a. Kapitel 3.1.10), zusammengestellt.

Tab. 23: Präzision des ADVIA 120 für die Parameter der Blutzelldifferenzierung beim Rind; $\bar{x} \pm SD_{in}$ = Mittelwert ± Standardabweichung innerhalb einer Probe bei Dreifachmessung; CV = Variationskoeffizient

Parameter / Einheit		ADVIA 120 Softwareversionen 1 - 4, **Präzision über verschiedene Serien hinweg bei Dreifachmessung**				**ADVIA 120 Präzision 25fach-Messung**
		Version1 n = 115	Version2 n = 30	Version3 n = 60	Version4 n = 30	
Neutrophile G. G/l	$\bar{x}$ ± SD	3,39 ± 2,12	3,41 ± 1,84	3,00 ± 1,87	5,27 ± 4,94	**4,19 ± 0,21**
	CV	14,92 %	4,00 %	6,04 %	4,45 %	**4,98 %**
Lymphozyten[l] G/l	$\bar{x}$ ± SD	4,43 ± 1,35	4,82 ± 1,57	4,53 ± 1,67	3,56 ± 1,63	**1,73 ± 0,38**
	CV	10,62 %	5,37 %	7,30 %	11,13 %	**22,03 %**
Monozyten[l] G/l	$\bar{x}$ ± SD	0,62 ± 0,38	0,46 ± 0,18	0,43 ± 0,23	0,63 ± 0,41	**0,56 ± 0,16**
	CV	18,08 %	15,89 %	26,39 %	31,03 %	**28,78 %**
Eosinophile G.[l] G/l	$\bar{x}$ ± SD	0,43 ± 0,31	0,56 ± 0,39	0,40 ± 0,43	0,25 ± 0,35	**0,10 ± 0,04**
	CV	19,50 %	11,29 %	20,35 %	31,15 %	**40,67 %**
Basophile G.[l] G/l	$\bar{x}$ ± SD	0,07 ± 0,03	0,12 ± 0,05	0,09 ± 0,07	0,09 ± 0,08	**0,08 ± 0,01**
	CV	19,58 %	12,74 %	18,97 %	18,39 %	**11,01 %**
LUC[l] G/l	$\bar{x}$ ± SD	0,04 ± 0,04	0,11 ± 0,06	0,05 ± 0,03	0,13 ± 0,11	**0,09 ± 0,07**
	CV	41,16 %	23,87 %	43,41 %	98,28 %	**82,75 %**

[l] logarithmierte Werte

Fortsetzung Tab. 23:

Parameter/ Einheit		ADVIA 120 Softwareversionen 1 - 4, **Präzision über verschiedene Serien hinweg bei Dreifachmessung**				**ADVIA 120 Präzision 25fach-Messung**
		Version1 n = 115	Version2 n = 30	Version3 n = 60	Version4 n = 30	
Neutrophile G %	$\bar{x}$ ± SD	36,06 ± 13,52	35,37± 12,37	34,43 ± 11,34	45,56 ± 19,31	**62,10 ± 3,30**
	CV	10,49 %	4,04 %	4,95 %	4,31 %	**5,31 %**
Lymphozyten[l] %	$\bar{x}$ ± SD	50,81 ± 13,15	51,01 ± 12,33	53,87 ± 11,03	42,82 ± 17,77	**25,60 ± 5,44**
	CV	9,78 %	4,40 %	6,50 %	10,32 %	**21,26 %**
Monozyten[l] %	$\bar{x}$ ± SD	6,83 ± 2,95	5,13 ± 2,38	5,14 ± 2,30	6,59 ± 2,58	**8,33 ± 2,42**
	CV	17,92 %	16,08 %	23,96 %	31,00 %	**29,06 %**
Eosinophile G[l] %	$\bar{x}$ ± SD	5,04 ± 3,57	0,56 ± 0,39	4,98 ± 5,28	2,80 ± 3,66	**1,49 ± 0,62**
	CV	18,99 %	11,29 %	19,57 %	29,17 %	**41,27 %**
Basophile G.[l] %	$\bar{x}$ ± SD	0,79 ± 0,36	0,12 ± 0,05	0,97 ± 0,56	0,92 ± 0,33	**1,15 ± 0,14**
	CV	17,94 %	12,74 %	19,16 %	19,97 %	**12,35 %**
LUC[l] %	$\bar{x}$ ± SD	0,47 ± 0,36	0,11 ± 0,06	0,61 ± 0,42	1,33 ± 0,96	**1,34 ± 1,11**
	CV	39,39 %	23,87 %	42,33 %	107,4 %3	**82,74 %**

[l] logarithmierte Werte

Die Wiederholbarkeit der Meßwerte für die 25-fach-Messung ist hinsichtlich der neutrophilen Granulozytengesamtzahl mit einem CV von 4,98 % als gut zu bezeichnen. Bezüglich der Lymphozyten und Monozyten betragen die Variationskoeffizienten 22 % bzw. 29 %. Eine schlechte Präzision wurde für die eosinophilen Granulozyten ermittelt (CV 40 %). Für die Population der basophilen Granulozyten konnte eine Wiederholbarkeit von 11,01 % errechnet werden. Die Gruppe der LUC zeigt mit einem Variationskoeffizienten von 83 % die schlechteste Wiederholbarkeit. Die Variationskoeffizienten der prozentualen

Differenzierungswerte weichen bei der Präzision innerhalb der Serie nur geringfügig von denen für die absoluten Werte des Differentialblutbildes ab.
Die Feststellung der Variationskoeffizienten für die Präzision von Serie zu Serie, erbrachte vergleichbare Ergebnisse zur Präzision innerhalb der Serie, für die neutrophilen Granulozyten- und Monozytendifferenzierung. Die Werte der eosinophilen Granulozyten zeigen eine verbesserte Präzision in den einzelnen Versionen (CV 11 % - 31 %). Niedrigere Variationskoeffizienten konnten auch bei der Lymphozytenzählung (CV 5 % - 11 %) in den einzelnen Versionen ermittelt werden. Bei den basophilen Granulozyten bewegt sich der Variationskoeffizient in allen Versionen zwischen 10 % und 20 %. Die Präzision der LUC ist in Übereinstimmung mit der Wiederholbarkeit bei der 25-fach-Messung ungenügend.

3.2.3 Verschleppung (carry over) und Linearität

Linearität und carry over werden anhand von Blutproben bestimmt, die eine starke Konzentration bzw. Verdünnung der zellulären Blutbestandteile aufweisen. Für diesen Gerätetest muß der Leukozytengehalt auf >120 G/l (100er-Pool) und die Thrombozytenzahl auf >2500 G/l (100er-Pool) angehoben werden. Um diese hohen Konzentrationen zu erreichen, müssen 80 ml K_3-antikoaguliertes EDTA-Blut zuerst 15 Minuten bei 300 G zentrifugiert, danach der Buffy coat abpipetiert und anschließend die Probe dem nächsten Schritt zugeführt werden. Dieser Schritt beinhaltete eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 G und anschließend zweimal über 5 Minuten bei 600 G.
Zur Erstellung einer Konzentration von 12 T/l Erythrozyten (100er-Pool) muss die Blutprobe 25 Minuten lang bei 750 G zentrifugiert werden. Aus den 100er-Pools werden in 20er Schritten Verdünnungsreihen hergestellt. Die Leerprobe (0-Pool) wird aus dem zellfreiem Plasma der Zentrifugationschritte gewonnen.
Bei der Feststellung der Linearität werden nacheinander die Verdünnungsstufen (0, 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 %) zweifach gemessen. Aufgrund der geringen

Varianz der Wiederholungsmessungen der Verdünnungsstufen wird anstelle des Varianzquotiententestes eine Korrelationsanalyse der Ergebnisse durchgeführt.

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse für die Linearitätsbestimmung der Parameter WBC, RBC, HGB und PLT aufgeführt. Angegeben wird der Korrelationskoeffizient **r** und die Hauptkomponentengleichung **y = mx + b**. Der analytische Bereich gibt die Zellkonzentration an, über die der Parameter getestet ist. Die Ergebnisse für alle untersuchten Parameter sind hoch signifikant ($p \leq 0{,}0001$).

Tab. 24: Ergebnisse der Linearitätsbestimmung für die Parameter RBC, HGB, WBC und PLT

Parameter/ Einheit		Linearität	Analytischer Bereich
RBC T/l	**r**	0,999	0 — 12 T/l
	y	0,13x - 0,09	
HGB mmol/l	**r**	0,999	0 — 12 mmol/l
	y	0,12x - 0,15	
WBC G/l	**r**	1,00	0 — 120 G/l
	y	1,29x - 0,05	
PLT G/l	**r**	0,983	0 — 2500 G/l
	y	21,77x + 356,10	

Zur Überprüfung des Carry over erfolgt sieben mal in Folge nach einer doppelten Messung des 0-Pools, eine Messung des 100er-Pools. Die Berechnung der Verschleppung wird durch die Subtraktion der Mittelwerte der zweiten 0-Pool-Messung von der ersten 0-Pool-Messung vorgenommen Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse der Überprüfung der Verschleppung von Blutzellen für die Parameter RBC, HGB, WBC und PLT zwischen aufeinanderfolgenden Messungen des ADVIA.

Tab. 25: Ergebnisse der Verschleppung (%) für die Parameter RBC, HGB, WBC und PLT

Parameter/ Einheit	**Verschleppung %**
RBC T/l	0,09
HGB mmol/l	0,00
WBC G/l	0,18
PLT G/l	0,26

Zu diesen Ergebnissen ist zu sagen, daß der angestrebte Wert von ≤ 0,25 % bei der Thrombozytenzählung geringgradig (0,26 %) überschritten wird. Die Messung im Hämoglobinkanal zeichnet sich durch keine meßbare Verschleppung aus. Die Verschleppung bei der Erythrozytenzählung ist mit 0,09 % und bei der Leukozytenzählung mit 0,18 % ebenfalls gering.

3.2.4 Blutalterung

Die Untersuchung von Blutproben wird in zunehmendem Maße von Großlaboratorien als Dienstleistung angeboten. Die Folge ist eine Verlängerung der Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Untersuchung. Der Einfluß dieser „Transportzeit” auf die Meßergebnisse bei unterschiedlicher Lagertemperatur (4 °C, 22 °C) über 72 Stunden, wird durch Messung zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden nach Blutentnahme in den nun folgenden Kapiteln beschrieben. Dazu wurden von zehn Rindern je zwei K_3-EDTA-Blutproben entnommen und für die Dauer dieser Untersuchung im Kühlschrank und bei Raumtemperatur gelagert.

Die statistische Auswertung der Meßwerte erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse. Die Ergebnisse für die Parameter der Blutzellzählung und Blutzelldifferenzierung sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

Die folgenden Tabellen (Tabelle 26 u. 27) enthalten die Ergebnisse der statistischen Auswertung getrennt nach Blutzellzählung und Differenzierung. Die Einteilung erfolgt nach dem Einfluß von Lagertemperatur, Lagerdauer sowie dem Einfluß beider Lagerbedingungen.

Tab. 26: Einfluß von Lagerdauer und Lagertemperatur auf die Meßergebnisse des ADVIA 120 anhand von Rinderblutproben; $n = 10$, p = Signifikanzniveau, n.s. = nicht signifikant

Parameter	**Einfluß der Lagertemperatur**	**Einfluß der Lagerdauer**	**Einfluß Lagerdauer und Lagertemperatur**
WBC	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,001$
RBC	n.s.	$p < 0,01$	$p < 0,01$
HGB	n.s.	n.s.	n.s.
HCT	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
MCV	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
MCH	n.s.	n.s.	n.s.
MCHC	n.s.	$p < 0,01$	n.s.
PLT	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,001$
MPV	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Lymphozyten abs.	n.s.	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Neutrophile G. abs.	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,05$
Eosinophile G. abs.	$p < 0,05$	$p < 0,001$	n.s.
Monozyten abs.	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Diese Zusammenstellung zeigt, daß der Einfluß von Lagerdauer und Lagertemperatur auf die Ergebnisse der Blutzellzählung wesentlich geringer ist als der Einfluß auf die Blutzelldifferenzierung.

3.2.4.1 Einfluß von Lagertemperatur und Lagerdauer auf die Blutzellzählung

Die Leukozytenzahl ist bei einer Lagerung bei 4 °C über 72 Stunden stabil, durch eine Lagerung bei Raumtemperatur werden die Abweichungen vom Ausgangswert ab 36 Stunden nach Blutentnahme größer, bleiben aber im Mittel unter zehn Prozent.

In der Abbildung 23 ist der Verlauf der Leukozytenzahl für eine Lagerung bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden vergleichend dargestellt.

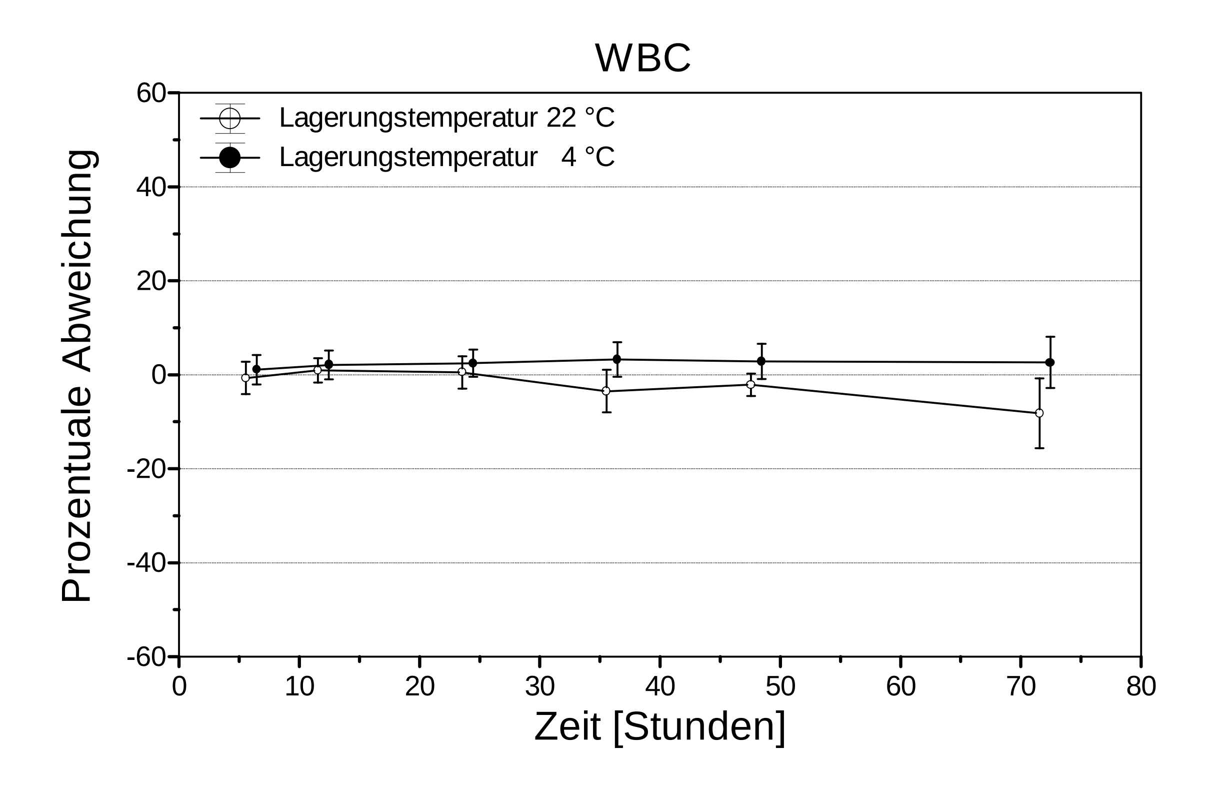


Abb. 23: Stabilität der Leukozytenzahl. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert ($\overline{x} \pm S$) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden, n=10

Die Auswirkungen der beiden Einflußgrößen Lagertemperatur und Lagerdauer auf die Erythrozytenzahl und den Hämoglobingehalt sind über den gesamten Untersuchungszeitraum sehr gering. Die Abbildung 24 zeigt den Verlauf der Erythrozytenzählung Der Abbildung 25 können die Ergebnisse für die Hämoglobinmessung entnommen werden.

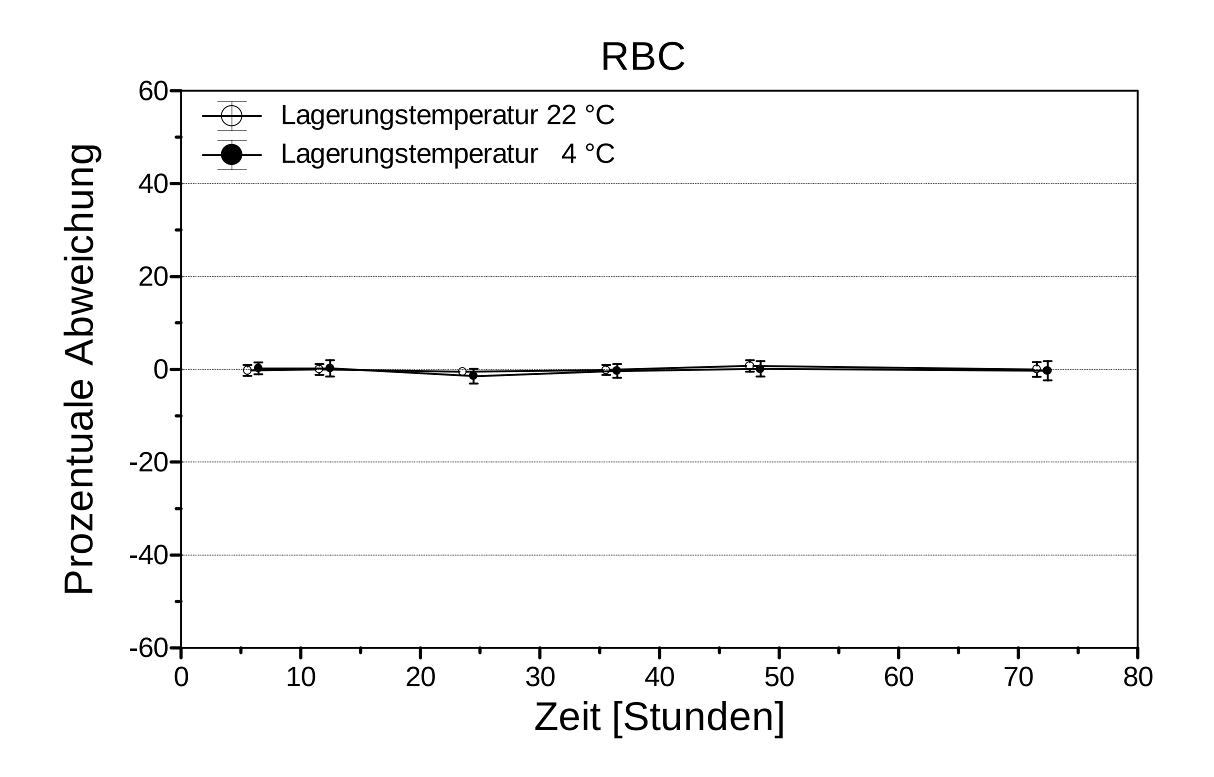


Abb. 24: Stabilität der Erythrozytenzahl. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert ($\overline{x}$ ± S) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden, n=10

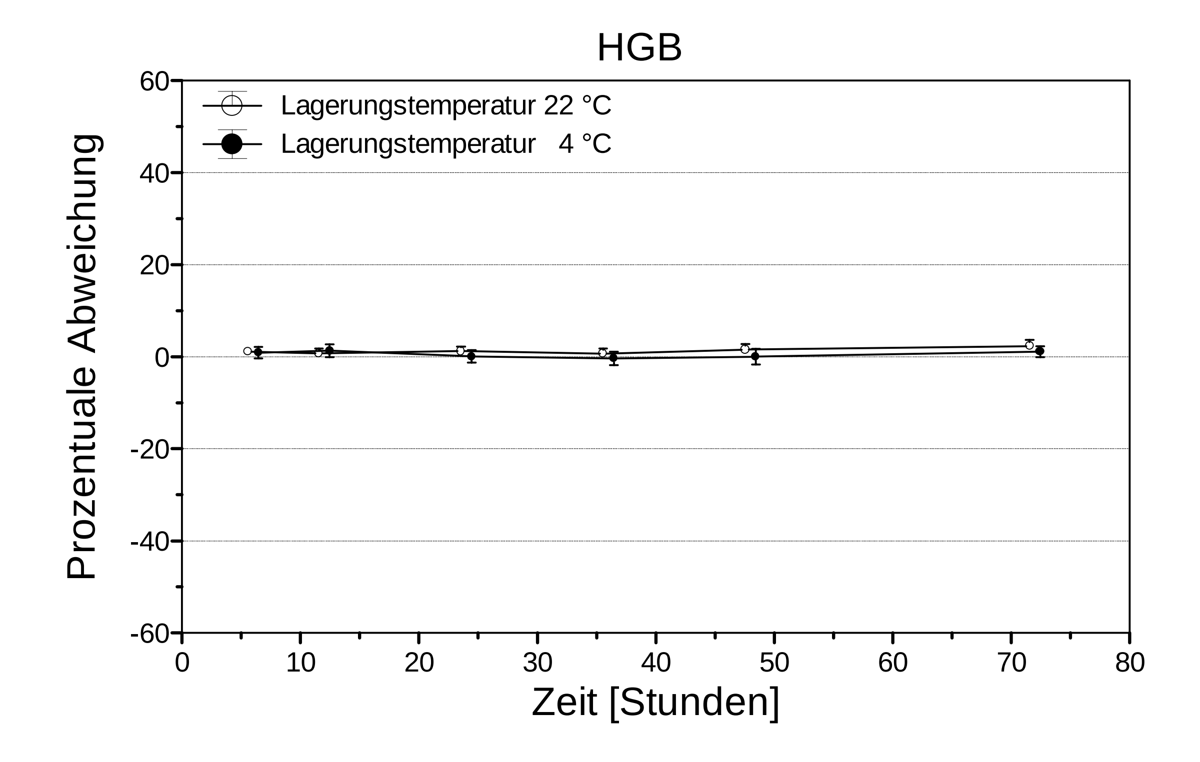


Abb. 25: Stabilität des Hämoglobingehaltes. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert ($\overline{x} \pm S$) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden, n=10

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse für die Parameter MCH und MCV vorgestellt.

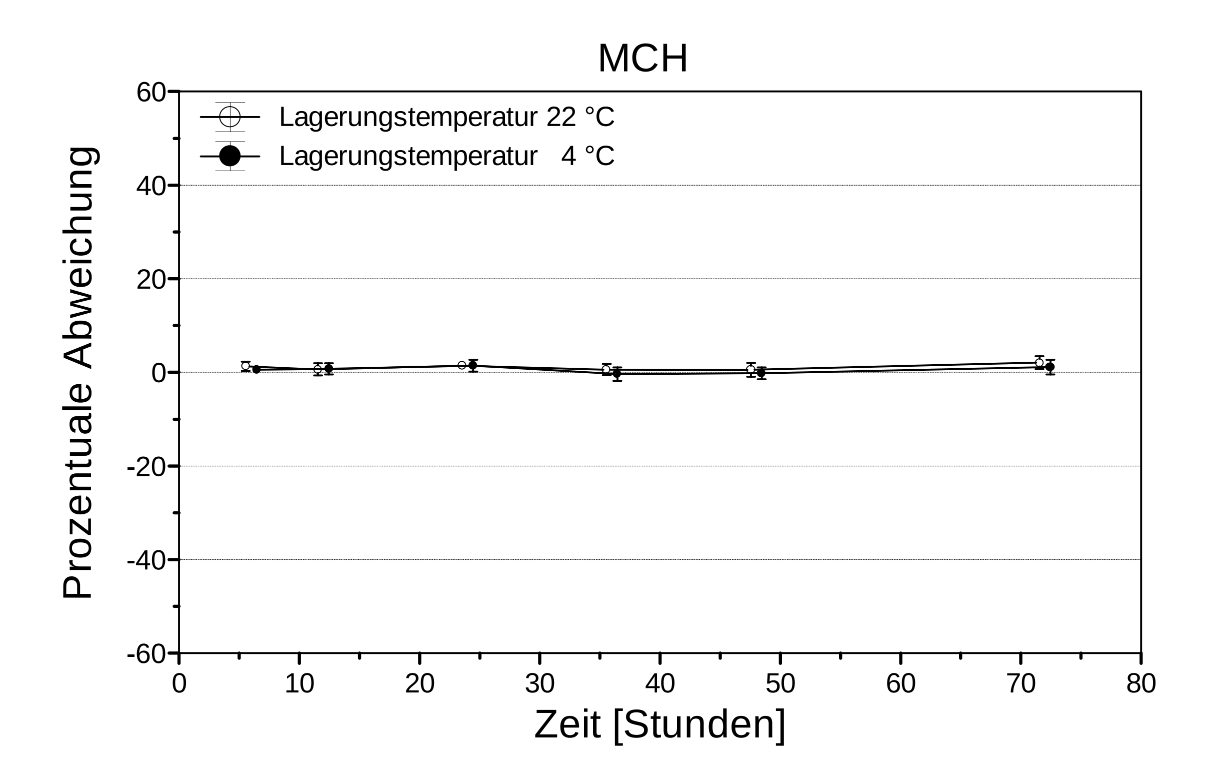


Abb. 26: Stabilität des mittleren Hämoglobingehaltes. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert ($\bar{x} \pm S$) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden, n=10

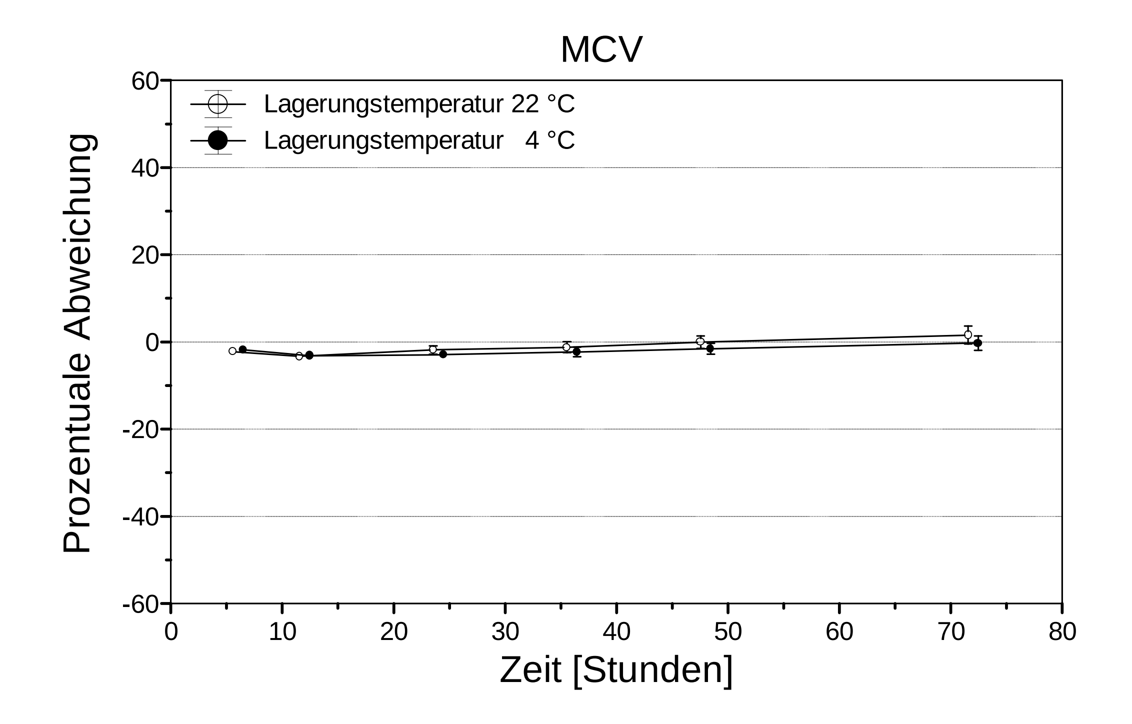


Abb. 27: Stabilität des mittleren Erythrozytenvolumens. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert ($\bar{x} \pm S$) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden, n=10

Das mittlere Erythrozytenvolumen, in Abbildung 27 dargestellt, nimmt zu Beginn der Lagerung leicht ab, um sich nach 36 Stunden Lagerung langsam dem Ausgangswert wieder anzugleichen. Die Ursache hierfür liegt in einem Flüssigkeitsverlust, der zu einer Volumenabnahme der Erythrozyten führt; dieses Phänomen kehrt sich nach einer längeren Lagerung um, so daß das Zellvolumen wieder ansteigt. Die Verlaufsuntersuchungen des Hämatokritwertes zeigen, wie in Abbildung 28 ersichtlich, den gleichen Verlauf. Die Lagerungstemperatur hat auf dieses Phänomen einen geringen Einfluß.

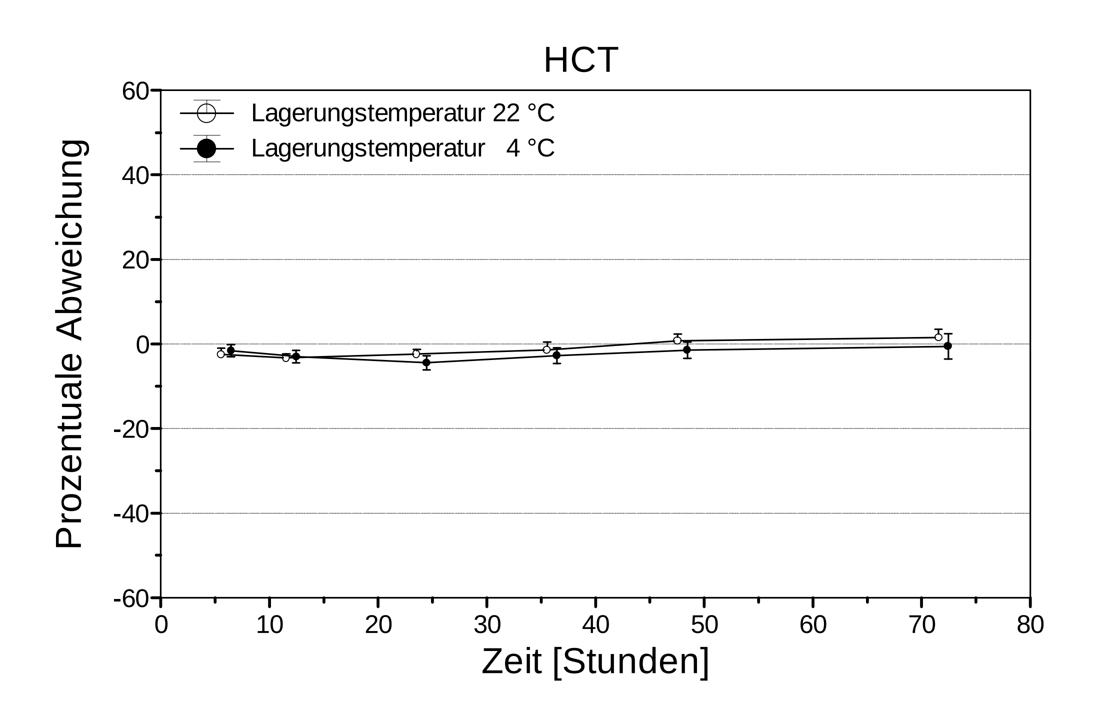
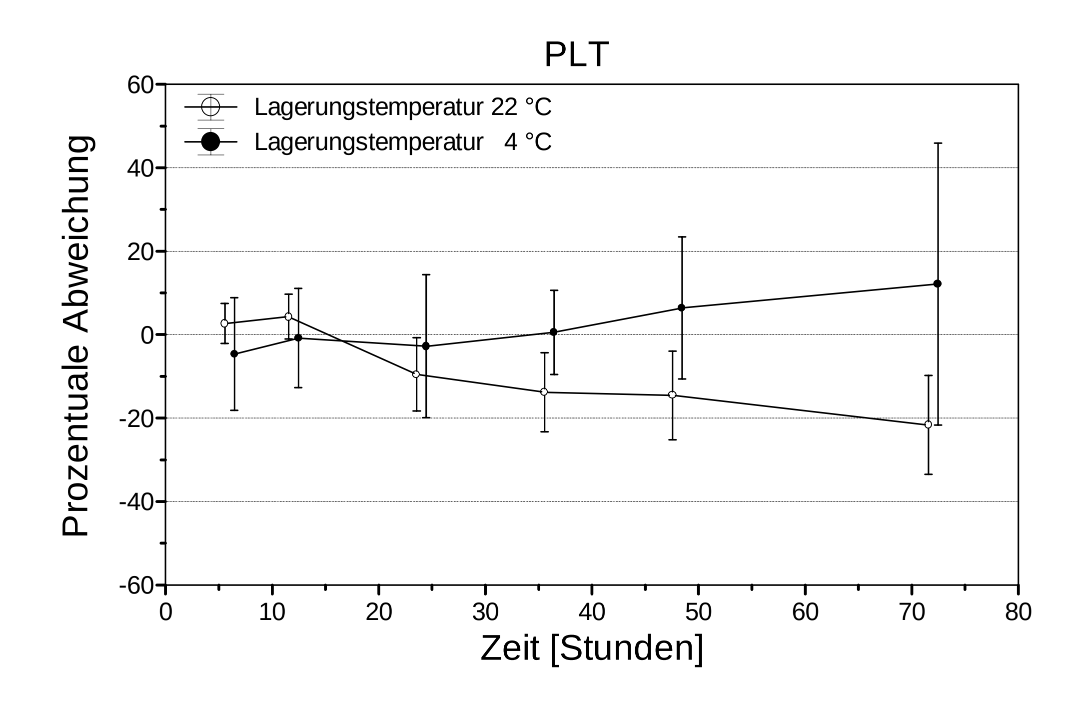


Abb. 28: Stabilität des Hämatokritwertes. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert ($\overline{x}$ ± S) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden. n=10

Der Einfluß der unterschiedlichen Lagerbedingungen auf die Thrombozytengesamtzahl ist in Abbildung 29 zu dargestellt. Hier zeigt sich, daß bei einer Lagerung bei 22 °C bis 12 Stunden nach Blutentnahme die Zahl der Thrombozyten um fünf bis zehn Prozent zunimmt. Nach diesem Zeitpunkt fällt die Thrombozytenzahl kontinuierlich ab, und nach 72 Stunden muß mit einer Verringerung der Thrombozytengesamtzahl, bezogen auf den Ausgangswert, von über 20 Prozent gerechnet werden. Bei einer Lagerung bei 4 °C ist der Verlauf über den Untersuchungszeitraum dem bei 22 °C entgegengesetzt. Auffällig ist auch die Streuung, die eine klinische Interpretation der Daten schon ab 12 Stunden Lagerung bei 4 °C unmöglich macht.

Auf den nun folgenden Abbildungen ist die Stabilität der Thrombozytenzahl und des mittleren Thrombozytenvolumens graphisch dargestellt.



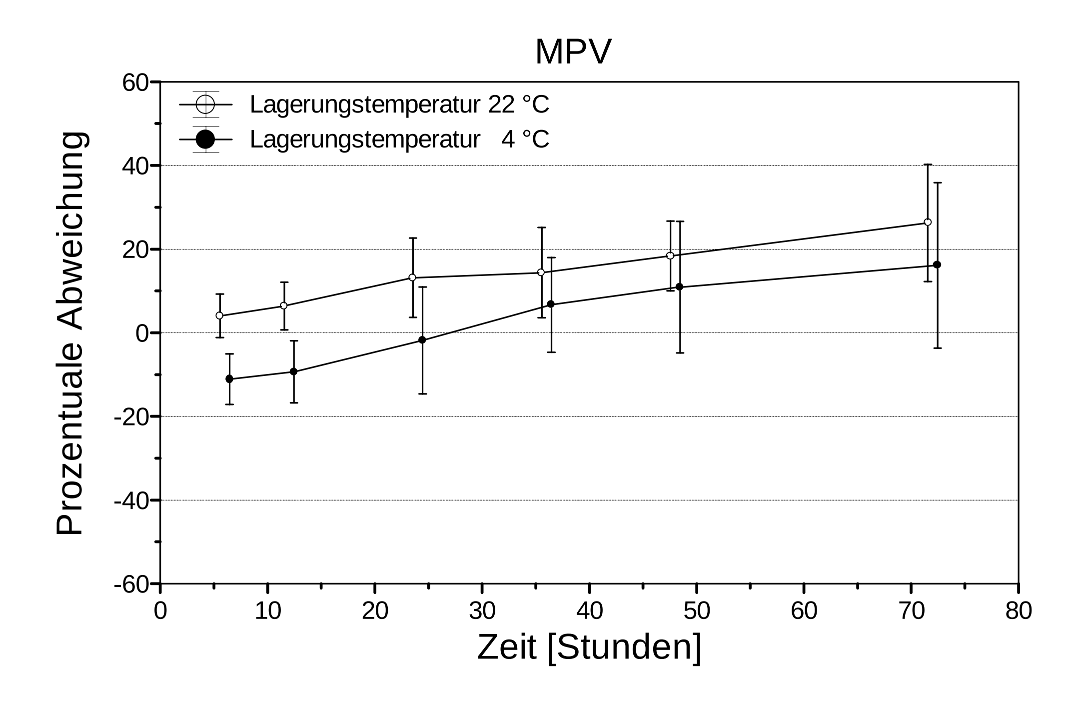


Abb. 29: Stabilität der Thrombozytenzahl und des Thrombozytenvolumens Dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert ($\overline{x} \pm S$) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden. n=10

Das mittlere Thrombozytenvolumen ist bei 4 °C Lagertemperatur sechs Stunden nach Blutentnahme im Mittel um zehn Prozent erniedrigt. Danach steigt der MPV im Mittel um bis zu 15 Prozent im Vergleich zum Entnahmezeitpunkt an. Eine Lagerung bei Raumtemperatur bedingt einen fortlaufenden Anstieg des mittleren Thrombozytenvolumens, das bei 72 Stunden nach Entnahme, den Ausgangswert um 25 Prozent übersteigt.

3.2.4.2 Einfluß von Lagertemperatur und Lagerdauer auf die Blutzelldifferenzierung

Die Zählung der neutrophilen Granulozyten unterliegt nur geringen Veränderungen, sofern die Probe nach der Entnahme bei 4 °C gelagert wird. Nach 72 Stunden beträgt die mittlere Abweichung vom Ausgangswert zehn Prozent. Durch eine Lagerung bei Raumtemperatur verkürzt sich die klinisch „unbedenkliche” Lagerzeit auf 24 Stunden. Abbildung 30 zeigt den Verlauf der absoluten neutrophile Granulozytenzahl bei diesen beiden Lagerungstemperaturen.

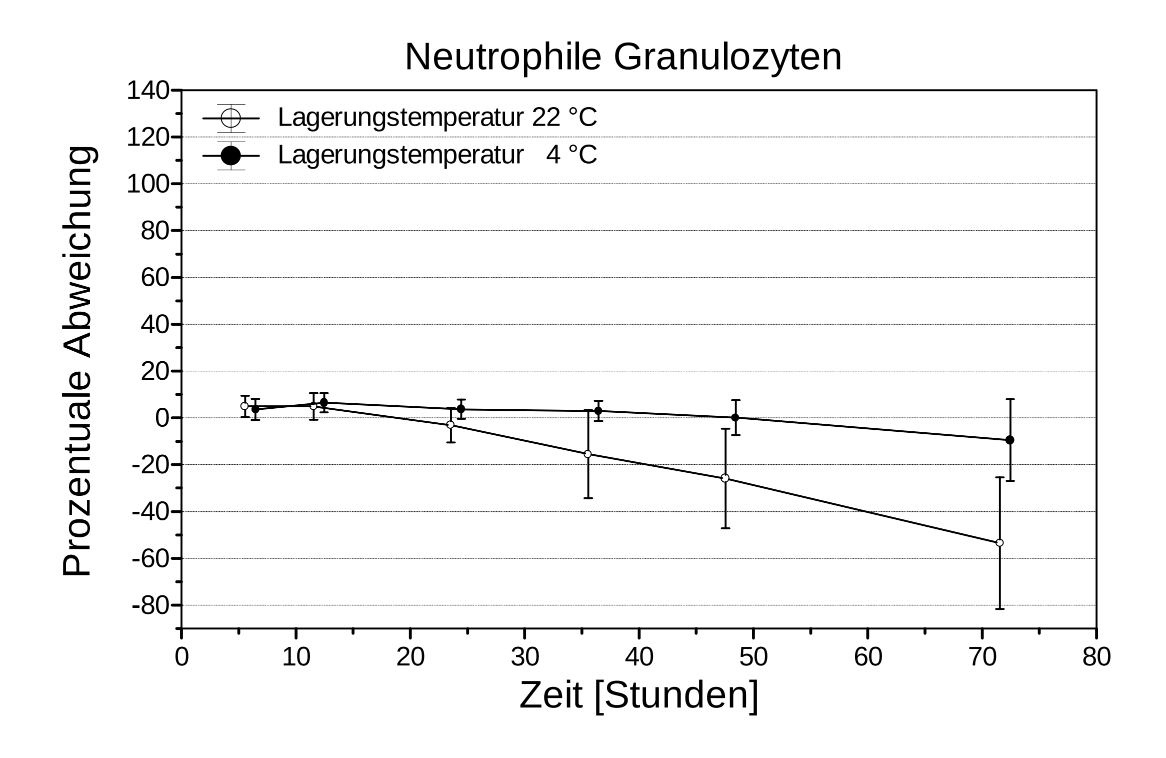


Abb. 30: Stabilität der absoluten neutrophilen Granulozytenzahl; dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert ($\overline{x} \pm S$) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden n = 10

Die Stabilität der Lymphozytenzahl ist ebenfalls stark abhängig von der Lagertemperatur. Eine Lagerung bei Raumtemperatur führt, wie auch bei den neutrophilen Granulozyten, zu einer erheblichen Streuung der Ergebnisse.

Aussagekräftige Werte können nur 12 bis 24 Stunden nach Probenentnahme ermittelt werden. Die Zahl der durch den ADVIA 120 erfaßten Lymphozyten nimmt über den gesamten Lagerungszeitraum stetig zu. Abbildung 31 zeigt die Verlaufskurven für die Lymphozytenzählung.

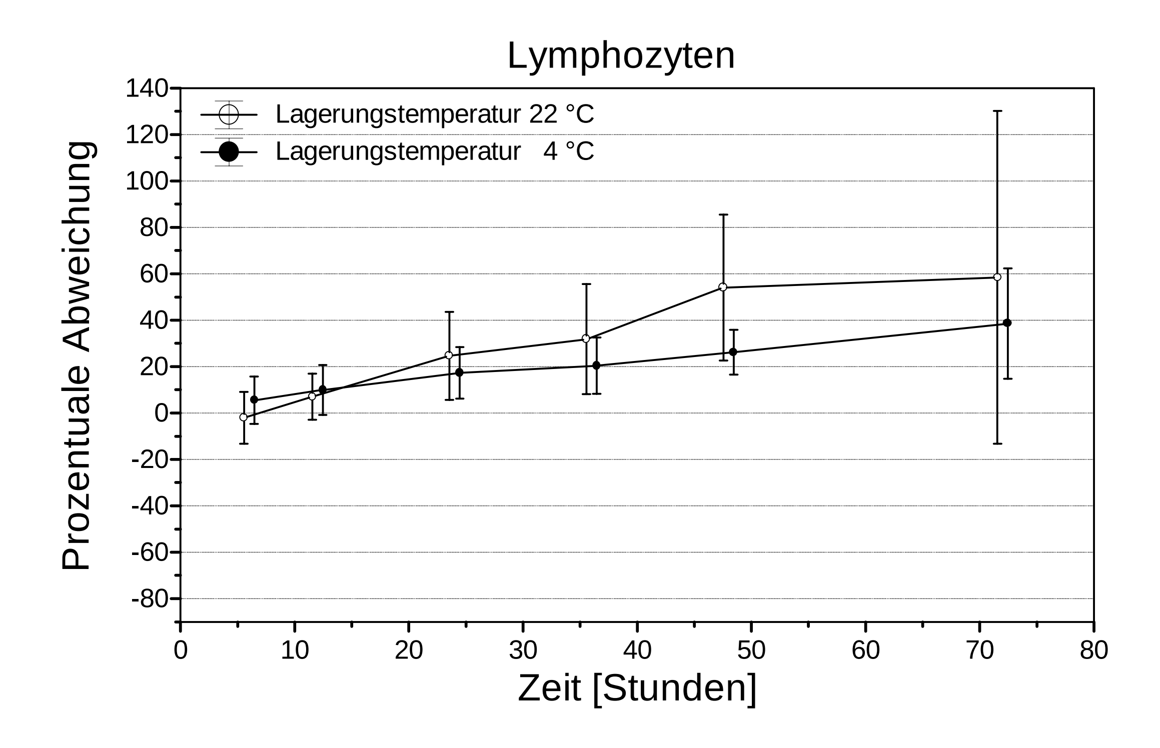


Abb. 31: Stabilität der absoluten Lymphozytenzahl; dargestellt ist die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert ($\overline{x} \pm S$) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden n = 10

Zur Darstellung der eosinophilen Granulozyten und der Monozyten wurden die absoluten Werte verwendet; die geringe Zellzahl führt zu einer Verzerrung der graphischen Auswertung bei prozentualer Darstellung. Abbildung 32 gibt den Verlauf der eosinophilen Granulozyten wieder. Die Zellzahl steigt über 72 Stunden an und zeigt bei Kühlschranklagerung eine geringe Streuung der Ergebnisse.

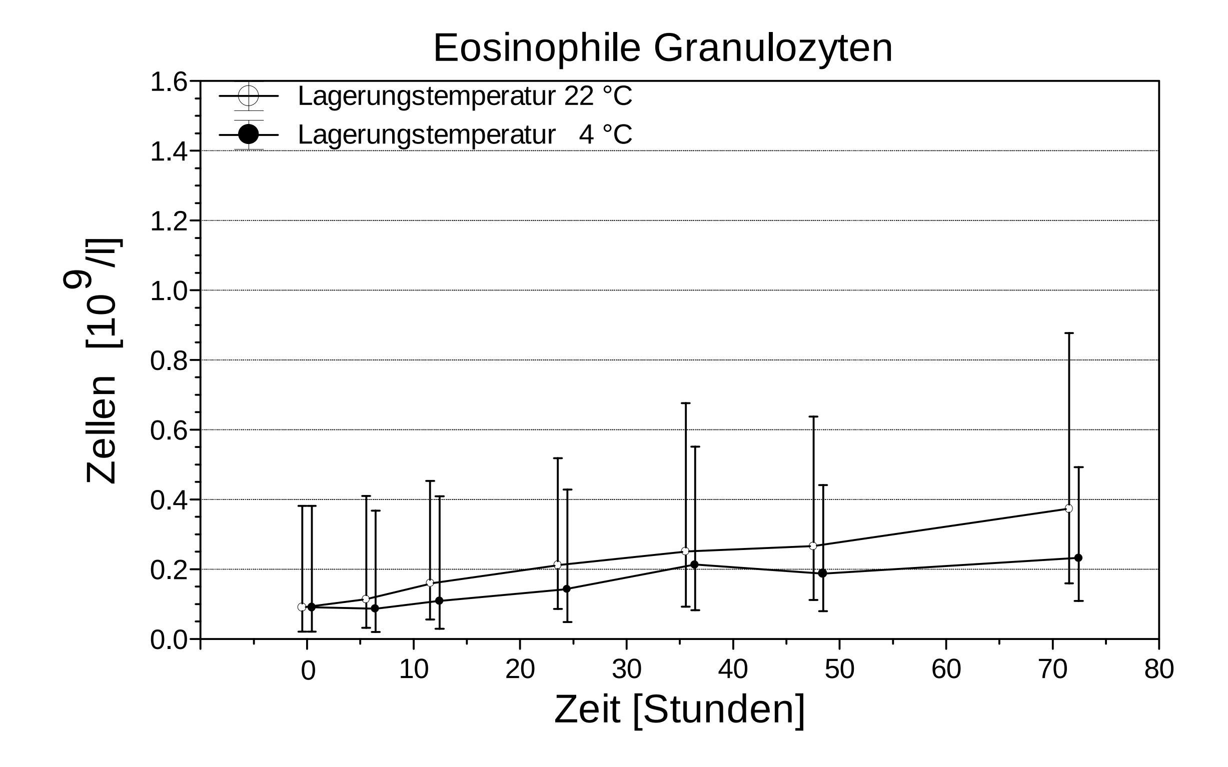
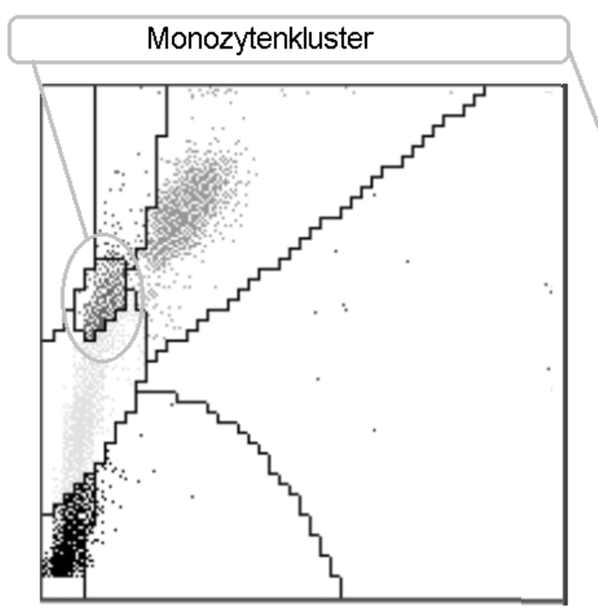


Abb. 32: Stabilität der absoluten eosinophilen Granulozytenzahl; dargestellt ist der absolute Verlauf ($\overline{x} \pm S$) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden n = 10

Auf den Abbildungen 33 bis 36 ist das Peroxidasezytogramm der Messungen unmittelbar nach Blutentnahme bzw. 24, 36 und 48 Stunden nach Probengewinnung abgebildet. An diesen Leukogrammen wird der Grund für die Verschiebungen der Ergebnisse der Blutzelldifferenzierung deutlich.

Zum Entnahmezeitpunkt umschließt das Cluster zur Monozytenzählung eine dichte Punktwolke. 24 Stunden später ist die Punktwolke weniger dicht. 48 Stunden später werden nur noch wenige Zellpunkte im Monozytencluster abgebildet. Die Ursache hierfür ist eine Größenverminderung und ein Verlust an endogener Peroxidase der Zellen durch die Lagerung, so daß die Monozytenpunktwolke in das darunterliegende Lymphozytencluster wandert und deren Zahl erhöht. Auf dem gleichem Prinzip beruht der kontinuierliche Anstieg der eosinophilen Granulozyten. Hier „rutschen” neutrophile Granulozyten in das eosinophile Granulozytencluster (auf Abbildung 33 bis 36 rechtes Cluster).



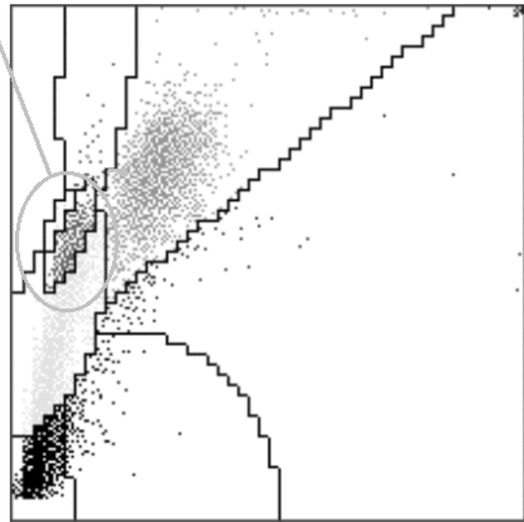
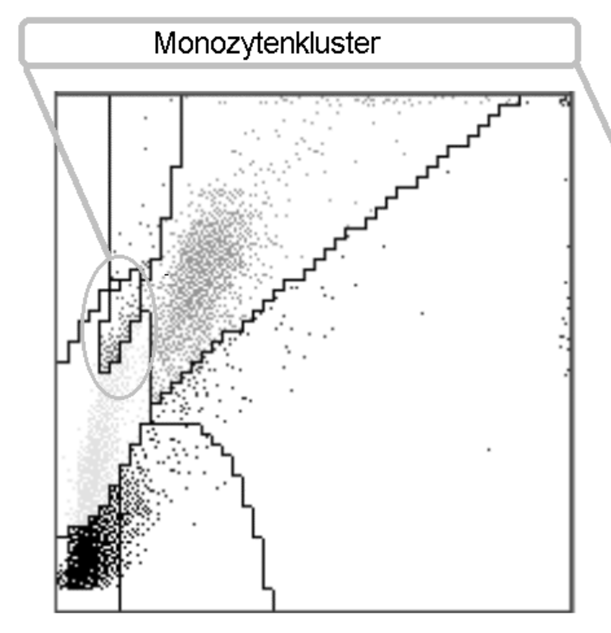


Abb. 33: Leukogramm der Blutzelldifferenzierung, unmittelbar nach Blutentnahme

Abb. 34: Leukogramm der Blutzelldifferenzierung 24 Stunden nach Blutentnahme



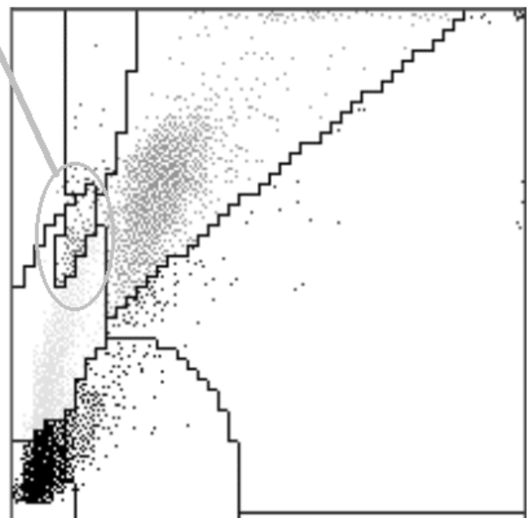


Abb. 35: Leukogramm der Blutzelldifferenzierung, 36 Stunden nach Blutentnahme

Abb. 36: Leukogramm der Blutzelldifferenzierung, 48 Stunden nach Blutentnahme

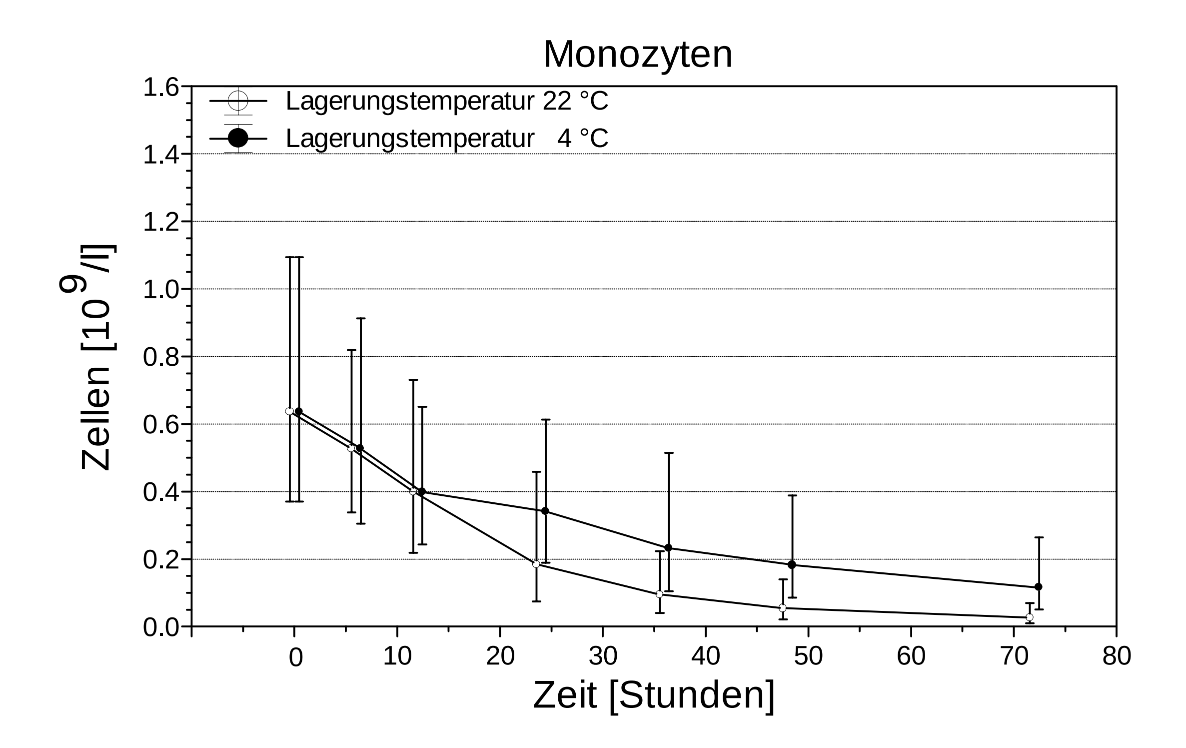


Abb. 37: Stabilität der absoluten Monozytenzahl; dargestellt ist der absolute Verlauf ($\overline{x} \pm S$) bei 4 °C und 22 °C über 72 Stunden n = 10

Auf der Abbildung 37 ist die Abnahme der Monozyten über den Untersuchungszeitraum graphisch aufgetragen. Eine Lagerung bei 4 °C kann die Abnahme der Monozytenzahl geringgradig verzögern.

3.2.5 Antikoagulanzienvergleich

Der Einfluß unterschiedlicher Antikoagulanzien wurde anhand von zehn Rinderblutproben mittels Dreifachmesseung festgestellt. Verglichen wurden die Gerinnungshemmer K_3-EDTA, Li-Heparin und Na-Citrat. Die Ergebnisse unter Verwendung von Na-Citrat wurden aufgrund der Verdünnung von 1:10 bei der Zellzählung mit dem Faktor 1,1 multipliziert.
Die Mittelwerte aus den Dreifachmessung der einzelnen Antikoagulanzien wurden zur Ermittlung einer globalen Signifikanz einer einfaktoriellen Varianzanalyse, mit Meßwiederholung im Einflußfaktor Antikoagulanz, zugeführt. Parameter mit signifikanten ($p > 0,05$) Unterschieden der Mittelwerte wurden daraufhin paarweise mittels t-Test für verbundene Stichproben ausgewertet. Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse konnten für die Parameter HCT, HGB, MCH, RDW, MPV sowie hinsichtlich des prozentualen Anteils der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Retikulozyten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Antikoagulanzien festgestellt werden. Die Tabellen 28 und 29 zeigen die Resultate der paarweisen Berechnung für die Parameter mit signifikantem Unterschied bei der globalen Bestimmung der Signifikanzen.

Tab. 27: Darstellung des mittleren und relativen Unterschiedes sowie der Standardabweichung zwischen den Antikoagulanzien K_3-EDTA, Na-Citrat und Li-Heparin für die Blutzellzählung (n = 10).

Paarweiser Vergleich der Antikoagulanzien, für die Parameter der Blutzellzählung ADVIA 120 (Softwareversion 4)				
Parameter/ Einheit		K_3-EDTA/ Li-Heparin	K_3-EDTA/ Na-Citrat	Li-Heparin/ Na-Citrat
WBC G/l	mittlerer Unterschied	1,05	1,00	0,99
	sd	1,06	1,04	1,08
	relativer Unterschied	5,20 %	0,46 %*	-1,00 %*
RBC T/l	mittlerer Unterschied	-0,08	-0,18	-0,10
	sd	0,13	0,16	0,15
	relativer Unterschied	-1.0 %*	-2,2 %	-1,24*
MCV fl	mittlerer Unterschied	0,52	1,00	0,48
	sd	0,27	0,28	0,11
	relativer Unterschied	1,60 %	3,00 %	1,40 %

[l] = logarithmierte Werte, *= nicht signifikant (p > 0,017)

Fortsetzung Tab. 27

Paarweiser Vergleich der Antikoagulanzien, für die Parameter der Blutzellzählung ADVIA 120 (Softwareversion 4)				
Parameter/ Einheit		K_3-EDTA/ Li-Heparin	K_3-EDTA/ Na-Citrat	Li-Heparin/ Na-Citrat
MCHC mmol/l	Mittlerer Unterschied	-0,29	-0,63	-0,34
	Sd	0,26	0,23	0,11
	relativer Unterschied	-1,2 %	-2,7 %	-1,4 %
CHCM mmol/l	mittlerer Unterschied	-0,47	-0,97	-0,51
	Sd	0,21	0,27	0,13
	relativer Unterschied	-1,9 %	-3,9 %	-2,1 %
PLT G/l	mittlerer Unterschied	214,10	169,84	-442,65
	Sd	126,16	756,23	963,31
	relativer Unterschied	-45,7 %	33,1 %	-94,5 %*
MPC g/dl	mittlerer Unterschied	-10,37	-26,06	-15,70
	Sd	0,96	16,63	16,15
	relativer Unterschied	-40,9 %	-96,8 %	-62,0 %

[l] = logarithmierte Werte, *= nicht signifikant (p > 0,017)

Tab. 28: Darstellung des mittleren, und relativen Unterschiedes sowie der Standardabweichung zwischen den Antikoagulanzien K_3-EDTA, Na-Citrat und Li-Heparin für die Blutzelldifferenzierung (n = 10).

Paarweiser Vergleich der Antikoagulanzien, für die Parameter der Blutzelldifferenzierung ADVIA 120 (Softwareversion 4)				
Parameter/ Einheit		K_3-EDTA / Li-Heparin	K_3-EDTA / Na-Citrat	Li-Heparin / Na-Citrat
Eosinophile G %	mittlerer Unterschied	-0,26	-0,29	-0,03
	sd	0,26	0,24	0,25
	relativer Unterschied	-45,0 %	-47,4 %	-4,5 %*
Basophile G. %	mittlerer Unterschied	-0,32	0,01	0,33
	sd	0,20	0,14	0,30
	relativer Unterschied	235,0 %	1,2 %*	25,3 %

[l] = logarithmierte Werte, *= nicht signifikant (p > 0,017)

Für die Leukozytenzählung beträgt der relative Unterschied zwischen Li-Heparin und K_3-EDTA 5,2 Prozent. Bei der Erythrozytenzählung konnte nur zwischen K_3-EDTA und Na-Citrat ein signifikanter relativer Unterschied von 2,2 Prozent festgestellt werden. MCV, CHCM und MCHC weisen beim Vergleich der Antikoagulanzien nur geringe relative Unterschiede auf. Erheblich Unterschiede von bis zu 96 Prozent traten für die Parameter PLT und MPC auf.

Bei der Blutzelldifferenzierung konnten für die relativen Anteile der eosinophilen und basophilen Granulozyten am Differentialblutbild signifikante Unterschiede festgestellt werden. Im Vergleich zum K_3-EDTA erzeugte die Verwendung von Na-Citrat die größten Verschiebungen. Der relative Unterschied zwischen Na-Citrat und Li-Heparin ist dagegen gering.

3.2.6 Alters- und Rasseabhängige Referenzbereiche

In dem nun folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Berechnung der Referenzbereiche in Form von Graphiken für einen Teil der Parameter vorgestellt. Die mathematischen Grundlagen für die Erstellung der Graphiken finden sich unter den Darstellungen. Jeder Parameter wird für drei eigenständige Altersgruppen angegeben. Die erste Gruppe enthält Tiere mit einem Alter kleiner 6 Monate, die zweite Gruppe Tiere zwischen 6 und 24 Monaten. In der letzten Gruppe werden die Daten der Rinder älter als 24 Monate zusammengefaßt. Die Einteilung der Altersgruppen erfolgt unter Zuhilfenahme eines lokal geglätteten Regressionsglätters (vgl. Kap. 3.1.8). Die graphische Darstellung erfolgt in zwei Diagrammen. Das erste Diagramm beschreibt den Verlauf der Daten für die Tiergruppen bis 6 Monate und 6 bis 24 Monate. Das zweite Diagramm gibt den Verlauf ab dem zweiten Lebensjahr bis zum Alter von zehn Jahren wieder.
Auf der y-Achse sind die Einheiten der Parameter aufgetragen, auf der x-Achse erfolgt die Angabe des Alters. Dabei muß beachtet werden, daß bei den Tieren bis zu zwei Jahren die Angabe der Einheit in Monaten und bei den Tieren über zwei Jahren in Jahren erfolgt. Jedes Diagramm enthält die Angaben für die Rinder der Rassen SB und DFV. Für die Fälle, in denen kein Rasseunterschied ermittelt werden konnte, wird das Rassenmittel angegeben.

Jede Altersgruppe und gegebenenfalls Rasse wird durch drei Geraden auf der Grafik beschrieben. Die mittlere Gerade (Regressionsgerade) stellt den Altersmittelwert dar. Die Berechnung der Regressionsgeraden erfolgt nach der folgenden Formel:

$$y(x) = a + b \cdot x$$

a = Y- Achsenabschnitt
b = Linearer Regressionskoeffizient
x = Alter

Addiert bzw. subtrahiert man von dem so erhaltenen Wert die Normbereichsgrenze, erhält man die obere bzw. untere Referenzbereichsgrenze. Die Normbereichsgrenze entspricht der annähernd doppelten Standerdabweichung.

Anschließend an die Grafik finden sich alle notwendigen statistischen Angaben zur Erstellung der Grafik und zur Berechnung der Referenzbereiche.

Die Gruppengröße der Probanden für die Berechnung der Referenzbereiche der Thrombozytenanalytik weicht von den übrigen Parametern ab.
Bei der Erstellung der Thrombozytenreferenzbereiche wurden bei der Systemmeldung Thrombozytenaggregate (PLT-CLM, NW) die Thrombozytenparameter aus der Berechnung der Referenzwerte herausgenommen. Dieses Warnsignal wird vom System gesetzt bei mehr als 350 registrierten Thrombozytenaggregaten.
Um den Einfluß aktivierter Thrombozyten auf die Referenzbereiche auszuschließen, werden nur Proben mit weniger als 350 Aggregaten in die Berechnung einbezogen.
Für die Retikulozytenanalytik fließen durch Fehlermeldungen des Analysesystems ebenfalls verminderte Probandenzahlen in die Berechnung der Referenzbereiche ein.

3.2.6.1 Referenzbereiche für die Parameter des roten Blutbildes

Die Parameter des roten Blutbildes werden in den Abbildungen 37 bis 49 dargestellt. Die Abbildungen 38 und 39 zeigen die Entwicklung der Erythrozytenzahl bis zu einem Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV.

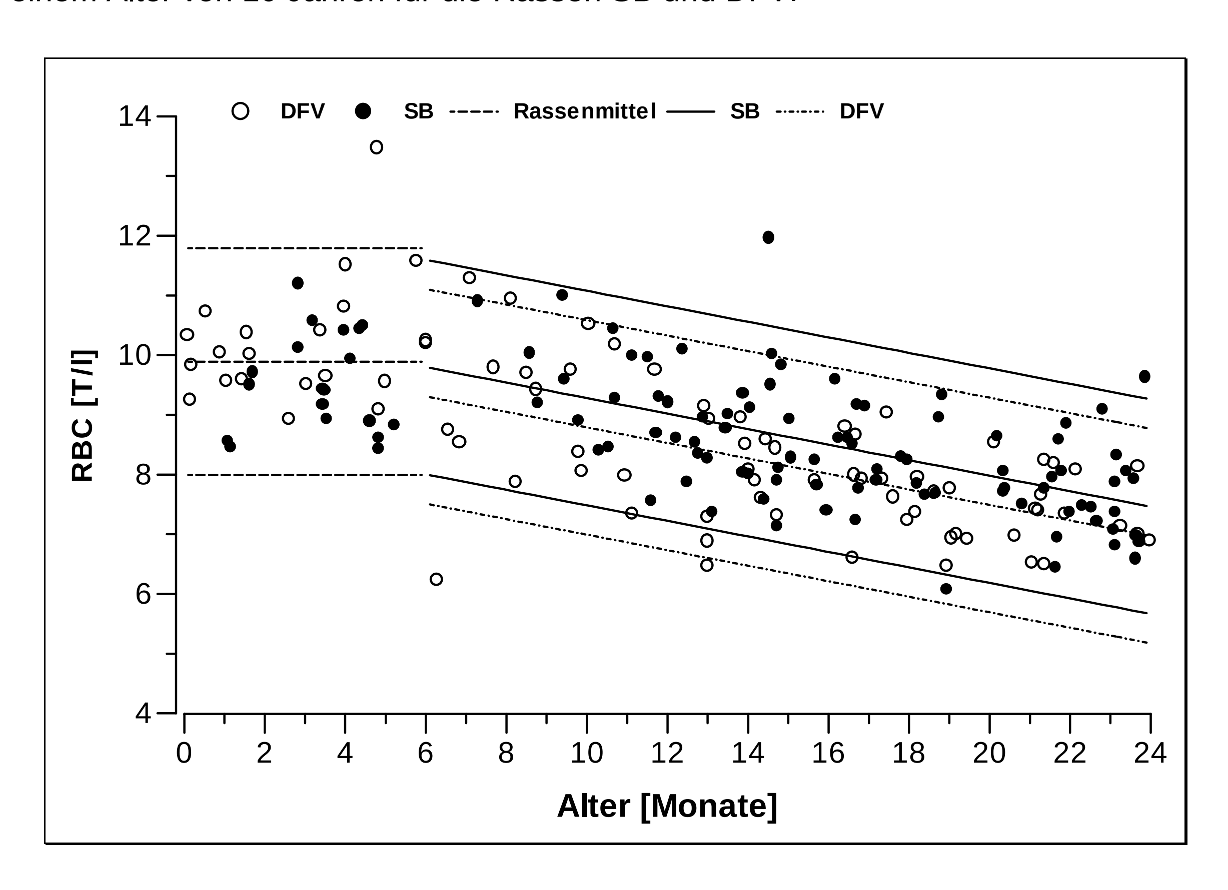


Abb. 38: Altersabhängige Entwicklung der **Erythrozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-gleichung:	**Altersgruppe < 6 Monate**	**Altersgruppe 6-24 Monate**
SB	y = 9,89	y = 10,60 – 0,13x
DFV	y = 9,89	y = 10,10 – 0,13x
Normbereichsgrenze:	±1,90	±1,80
t-Wert:	2,026	1,976

Signifikanzen:		
Rasseabhängigkeit:	p = 0,05	p < 0,001
Altersabhängigkeit:	n.s.	p < 0,001
Freiheitsgrade SB:	n = 19	n = 89
DFV:	n = 21	n = 63

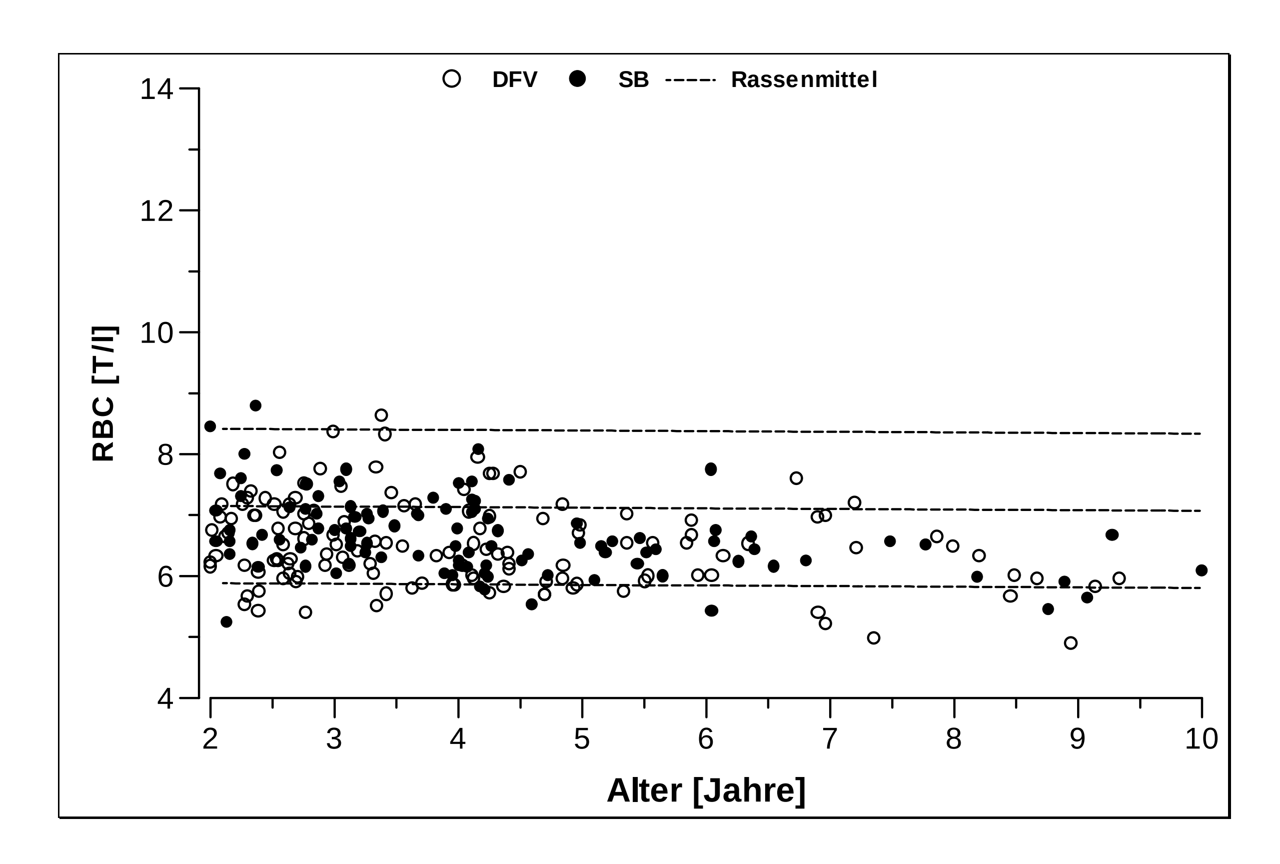


Abb. 39: Altersabhängige Entwicklung der **Erythrozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-		**Altersgruppe > 2 Jahre**
gleichung:	SB	y = 7,17 – 0,01 x
	DFV	y = 7,17 - 0,01 x
Normbereichsgrenze:		$\pm$1,27
t-Wert:		1,97

Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		n.s.
Altersabhängigkeit:		p < 0,001
Freiheitsgrade	SB:	n = 105
	DFV:	n = 135

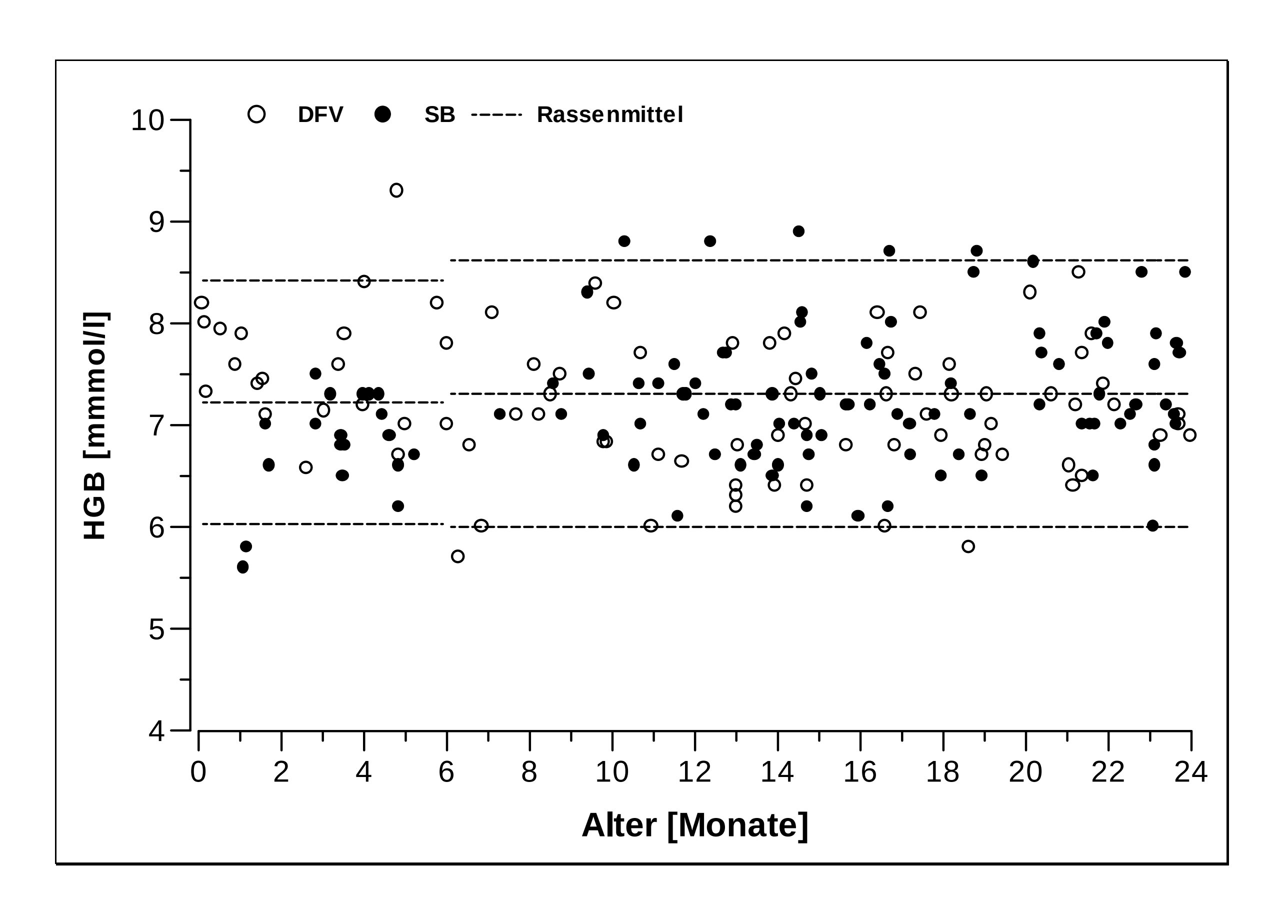


Abb. 40: Altersabhängige Entwicklung des **Hämoglobingehaltes** für die Rinder rassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-	**Altersgruppe < 6 Monate**	**Altersgruppe 6-24 Monate**
gleichung: SB	y = 7,22	y = 7,31
DFV	y = 7,22	y = 7,31
Normbereichsgrenze:	±1,20	±1,31
t-Wert:	2,026	1,976
Signifikanzen:		
Rasseabhängigkeit:	n.s.	n.s.
Altersabhängigkeit:	n.s.	n.s.
Freiheitsgrade SB:	n = 19	n = 89
DFV:	n = 21	n = 63

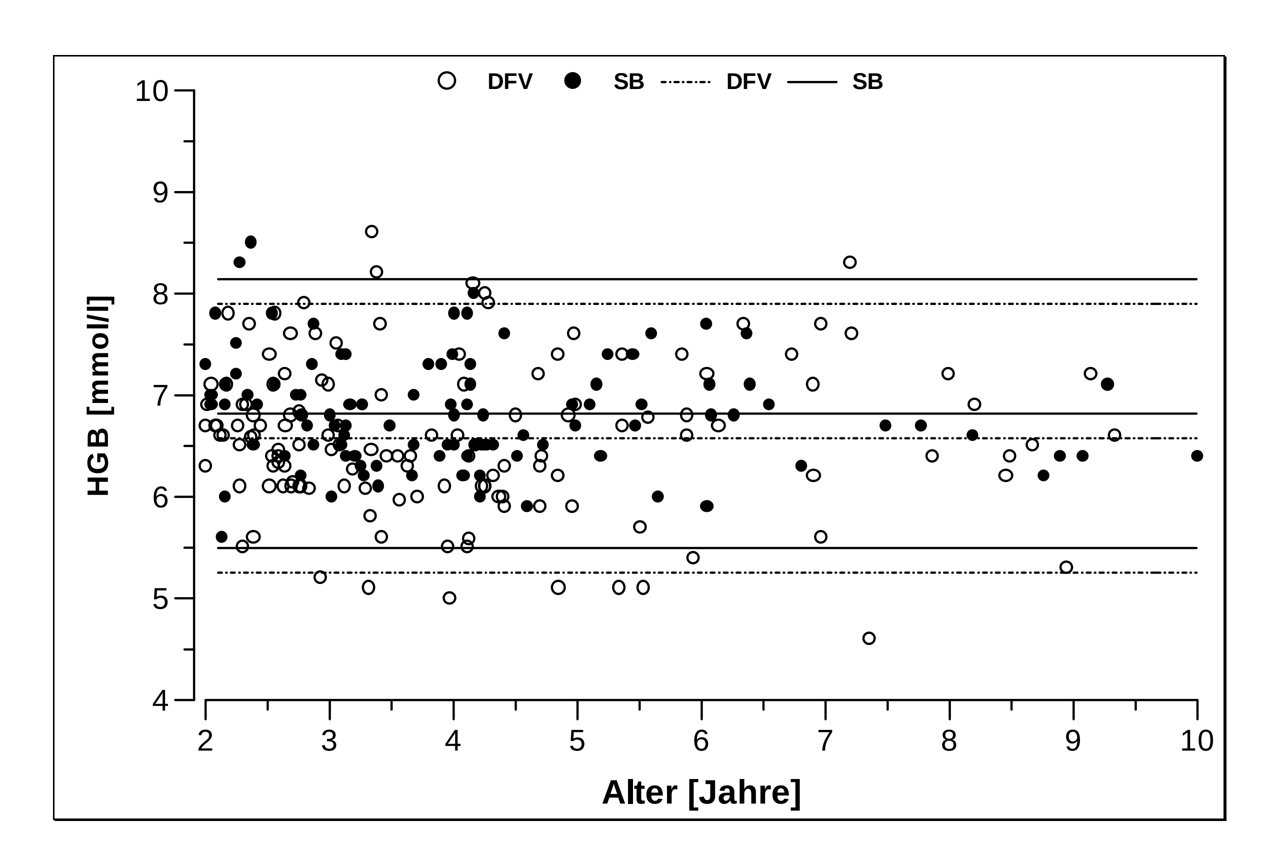


Abb. 41: Altersabhängige Entwicklung des **Hämoglobingehaltes** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe > 2 Jahre**
	SB	y = 6,82
	DFV	y = 6,58
Normbereichsgrenze:		±1,32
t-Wert:		1,97

Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		$p < 0,05$
Altersabhängigkeit:		n.s.
Freiheitsgrade	SB:	n = 105
	DFV:	n = 135

Abbildung 42 und 43 zeigen die Entwicklung des Hämatokritwertes bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV. Eine Unterteilung in der Altersgruppe <24 Monate war hier nicht erforderlich.

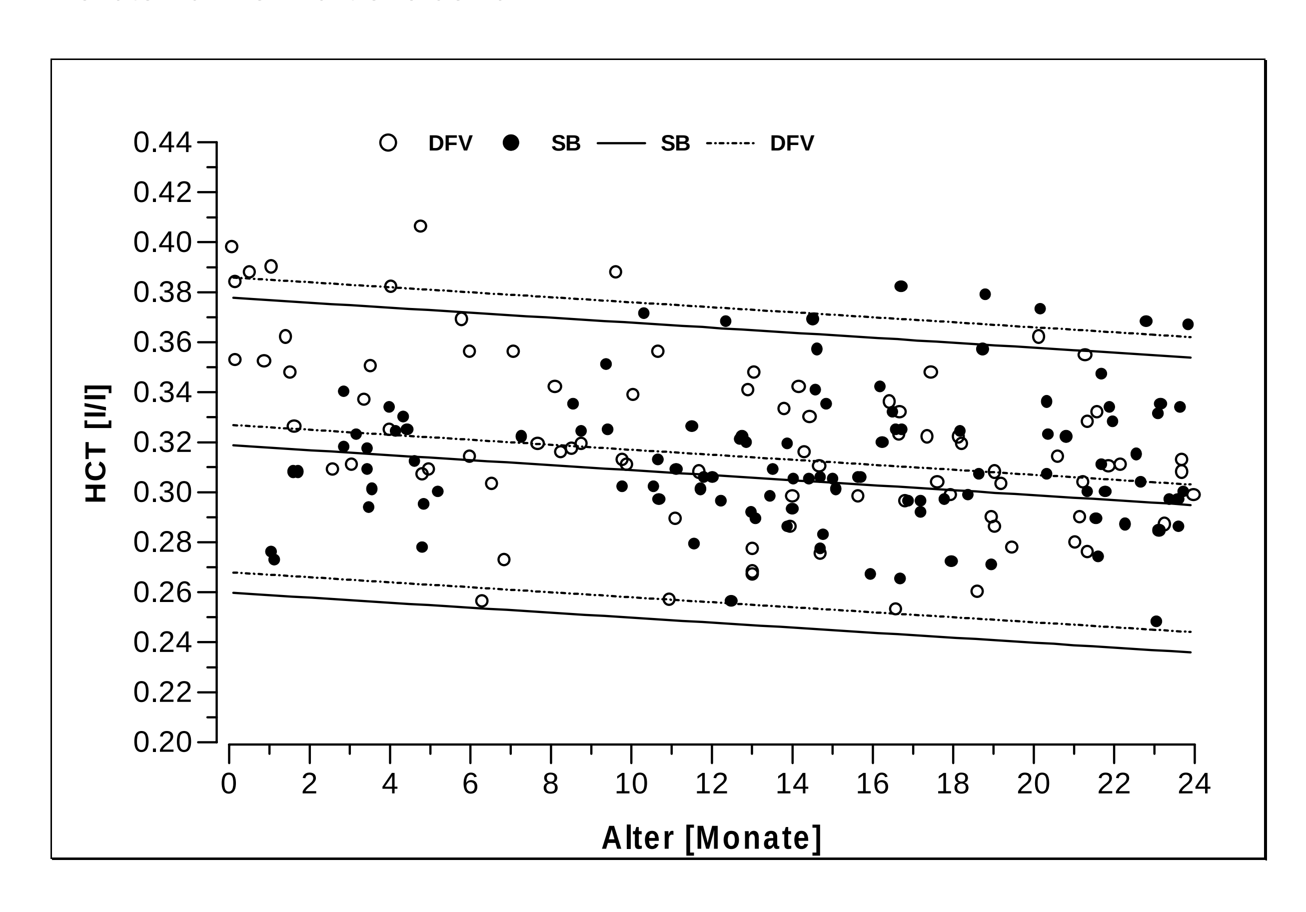


Abb. 42: Altersabhängige Entwicklung des **Hämatokritwertes** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe < 24 Monate**
	SB	y = 0,319 – 0,001x
	DFV	y = 0,327 - 0,001x
Normbereichsgrenze:		±0,059
t-Wert:		2,0262

Signifikanzen:		
Rasseabhängigkeit:		p < 0,001
Altersabhängigkeit:		p < 0,05
Freiheitsgrade SB:		n = 108
	DFV:	n = 84

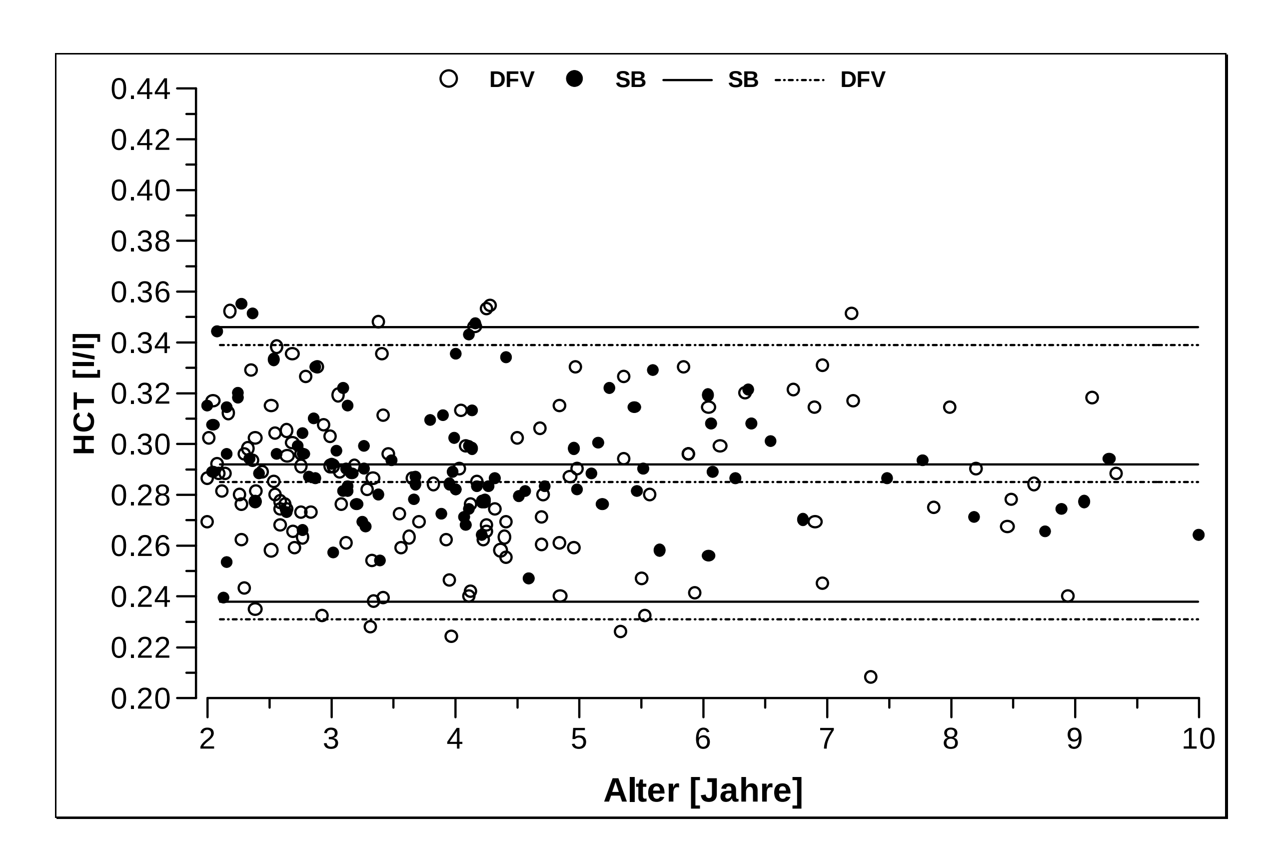


Abb. 43: Altersabhängige Entwicklung des **Hämatokritwertes** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe > 2 Jahre**
	SB	y = 0,292
	DFV	y = 0,285
Normbereichsgrenze:		±0,054
t-Wert:		1,97
Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		p < 0,05
Altersabhängigkeit:		n.s.
Freiheitsgrade	SB:	n = 105
	DFV:	n = 135

Abbildung 43 und 44 zeigen die Entwicklung des Mittleren Erythrozytenvolumens bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV.

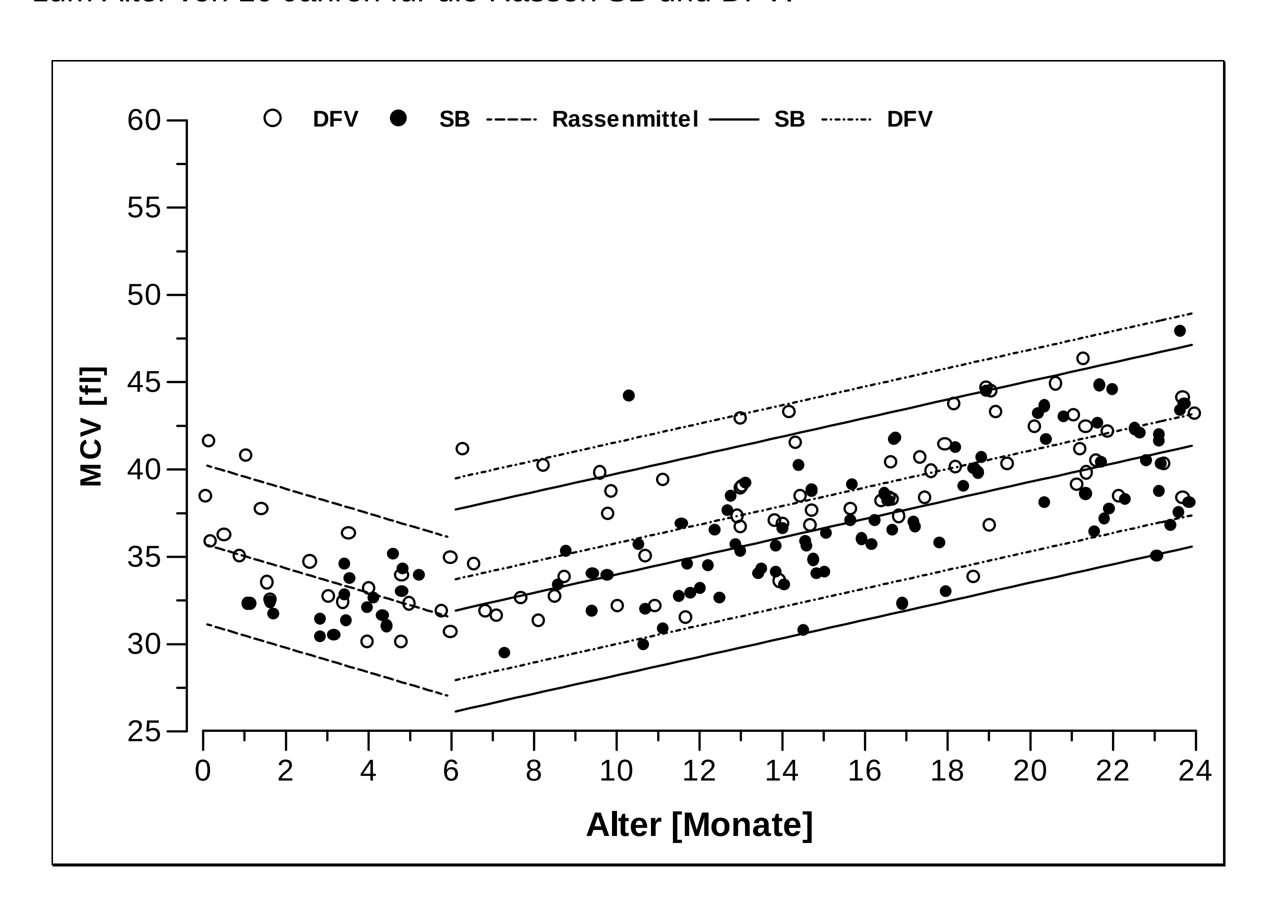


Abb. 44: Altersabhängige Entwicklung des **Mittleren Erythrozytenvolumens** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe < 6 Monate**	**Altersgruppe 6-24 Monate**
	SB	y = 35,75 – 0,703x	y = 28,69 + 0,53x
	DFV	y = 35,75 – 0,703x	y = 30,49 + 0,53x
Normbereichsgrenze:		±4,547	±5,777
t-Wert:		2,0262	1,976
Signifikanzen:			
Rasseabhängigkeit:		n.s.	p < 0,001
Altersabhängigkeit:		n.s.	p < 0,001
Freiheitsgrade	SB:	n = 19	n = 89
	DFV:	n = 21	n = 63

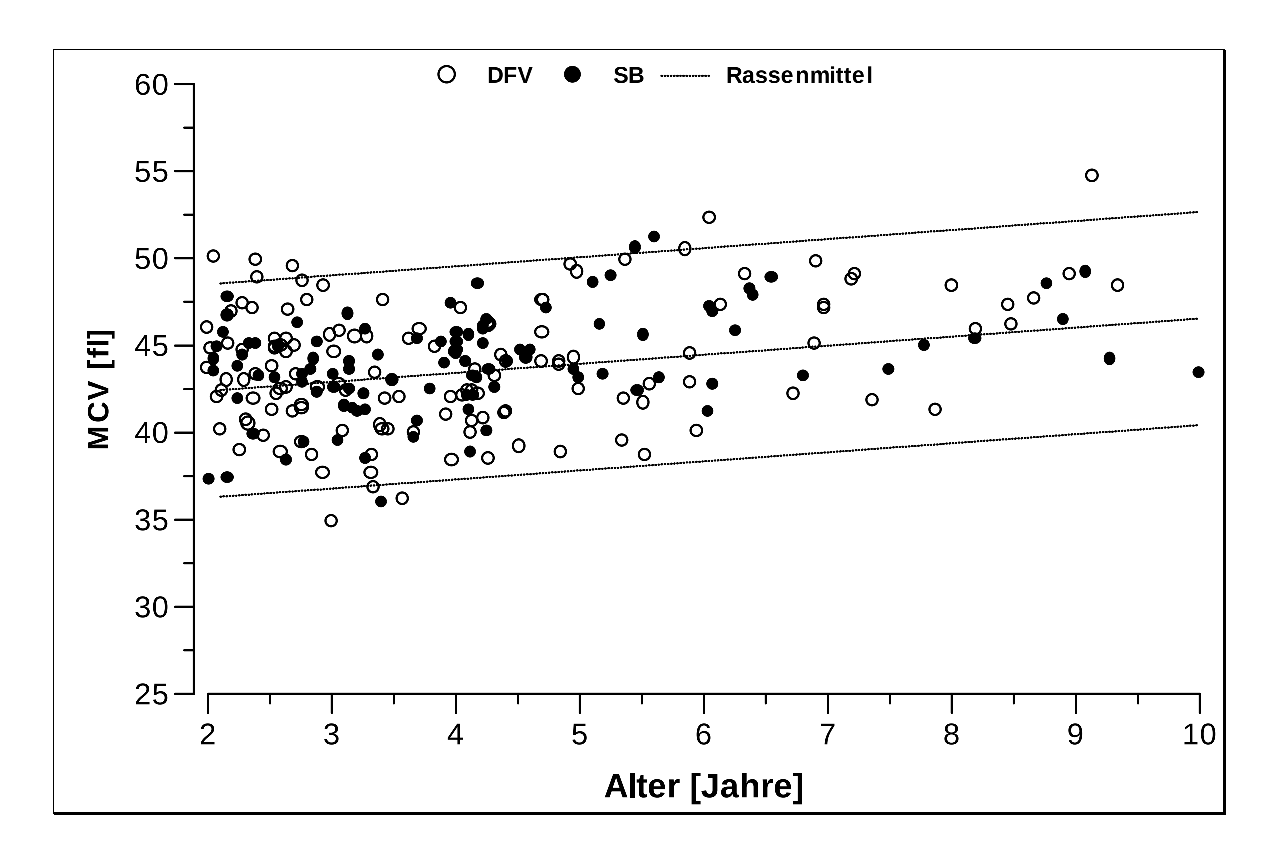


Abb. 45: Altersabhängige Entwicklung des **Mittleren Erythrozytenvolumens** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

	Altersgruppe > 2 Jahre
Regressionsgeraden-gleichung: SB	y = 41,35 + 0,05x
DFV	y = 41,35 + 0,05x
Normbereichsgrenze:	±6,12
t-Wert:	1,97

Signifikanzen :

Rasseabhängigkeit:	n.s.
Altersabhängigkeit:	p < 0,001
Freiheitsgrade SB:	n = 105
DFV:	n = 135

Abbildung 46 und 47 zeigen die Entwicklung des CHCM bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV.

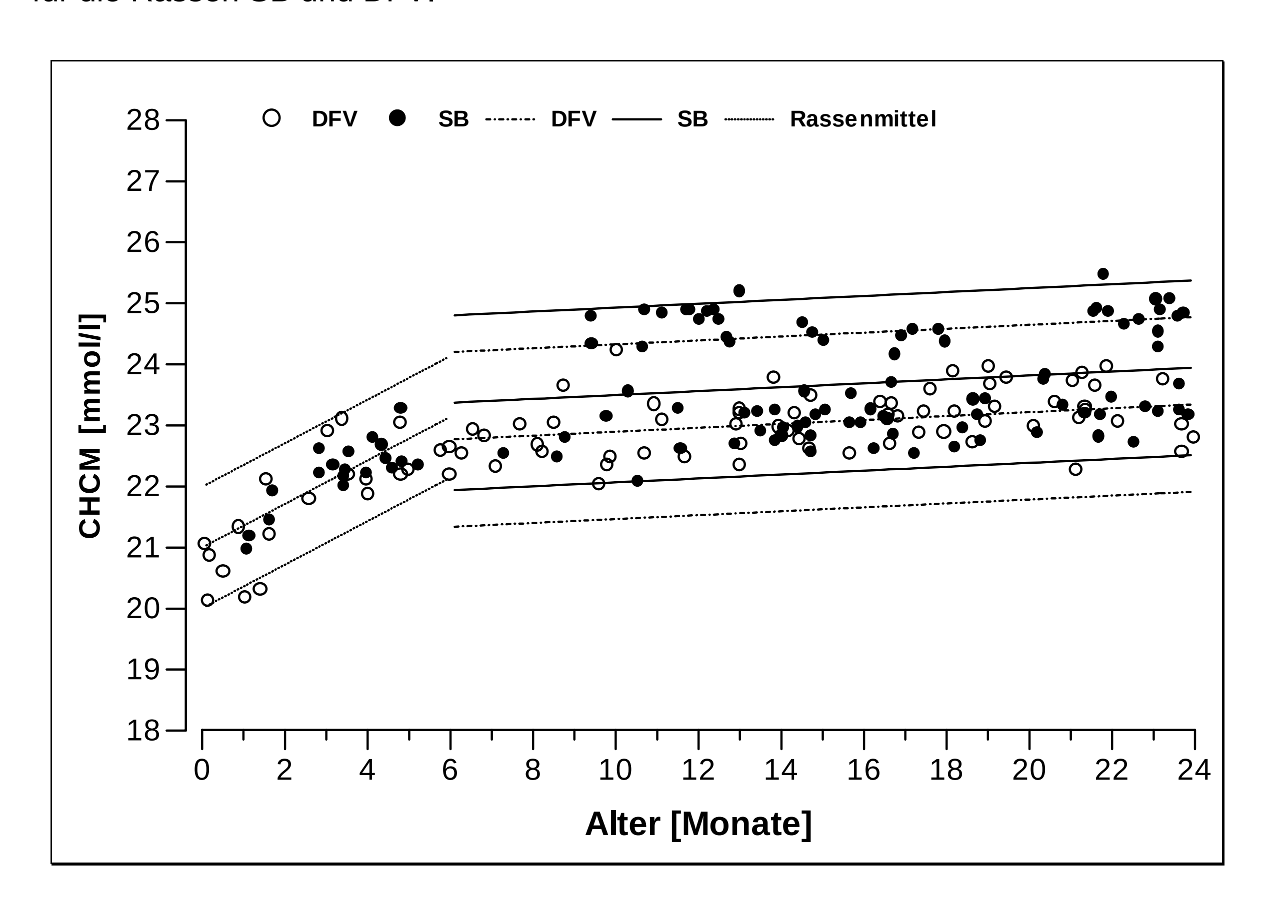


Abb. 46: Altersabhängige Entwicklung des **CHCM** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe < 6 Monate**	**Altersgruppe 6-24 Monate**
	SB	y = 21 + 0,36 x	y = 23,18 + 0,03 x
	DFV	y = 21 + 0,36 x	y = 22,58 + 0,03 x
Normbereichsgrenze:		±1,00	±1,430
t-Wert:		2,0262	1,976
Signifikanzen:			
Rasseabhängigkeit:		n.s.	p < 0,001
Altersabhängigkeit:		p < 0,001	p < 0,05
Freiheitsgrade SB:		n = 19	n = 89
	DFV:	n = 21	n = 63

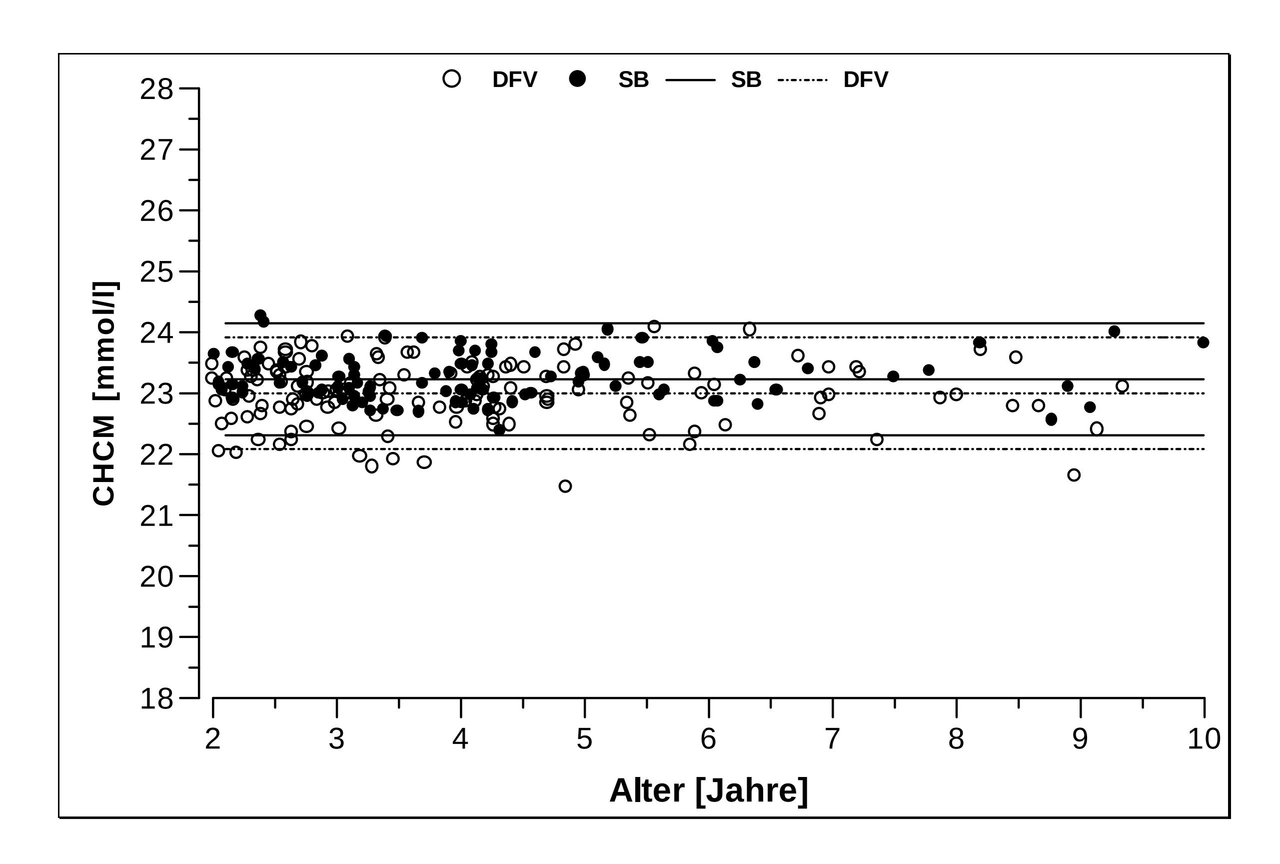


Abb. 47: Altersabhängige Entwicklung des **CHCM** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-	**Altersgruppe > 2 Jahre**
gleichung: SB	y = 23,23
DFV	y = 23,00
Normbereichsgrenze:	±0,918
t-Wert:	1,97
Signifikanzen :	
Rasseabhängigkeit:	p < 0,001
Altersabhängigkeit:	n.s.
Freiheitsgrade SB:	n = 105
DFV:	n = 135

Abbildung 48 und 49 zeigen die Entwicklung der Retikulozytenzahl bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV.

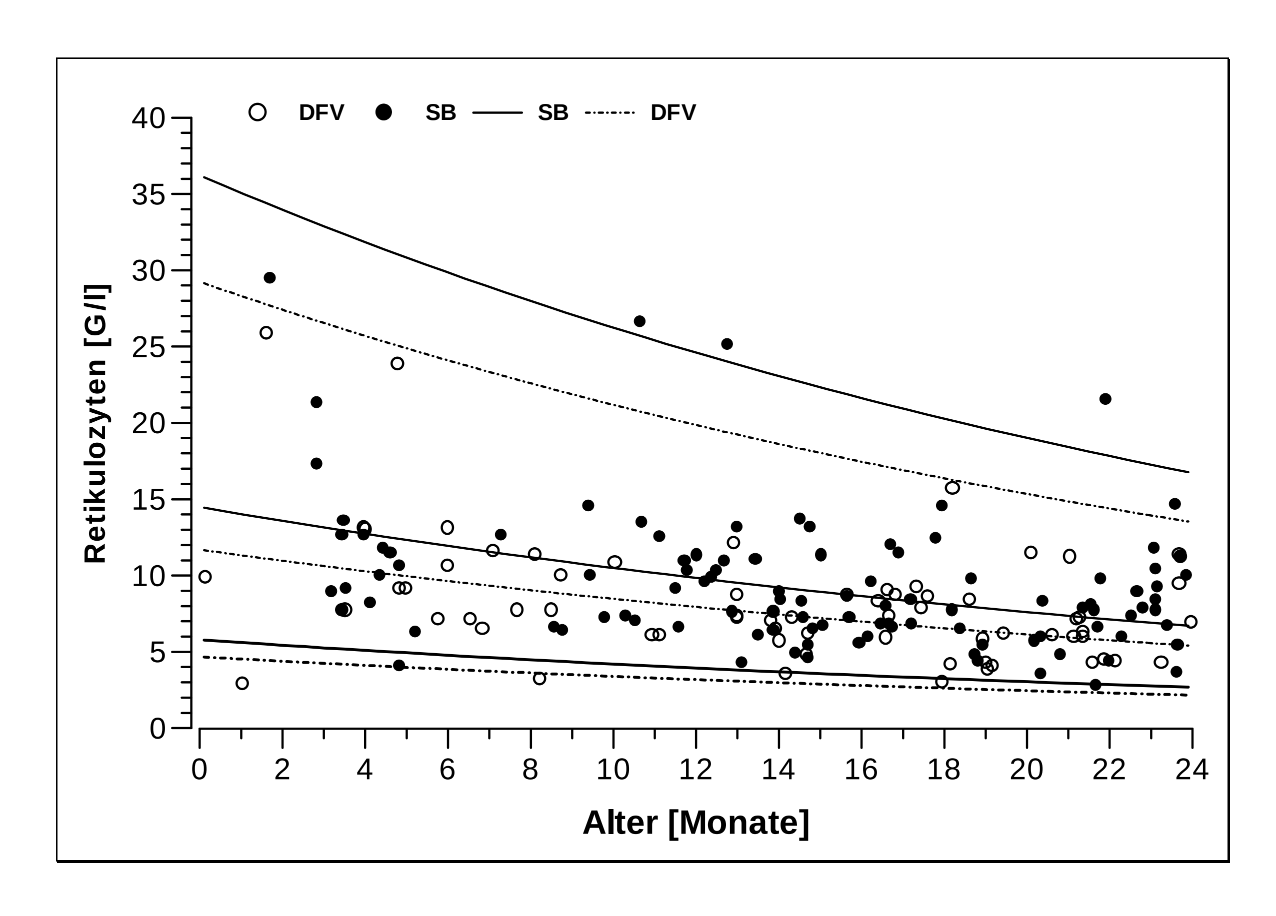


Abb. 48: Altersabhängige Entwicklung der **Retikulozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe < 24 Monate**
	SB	y = lg(1,16 - 0,014x)
	DFV	y = lg(1,07 - 0,014x)
Normbereichsgrenze:		±lg0,398
t-Wert:		1,9739

Signifikanzen:

Rasseabhängigkeit:	p < 0,05
Altersabhängigkeit:	p < 0,001
Freiheitsgrade SB:	n = 108
DFV:	n = 67

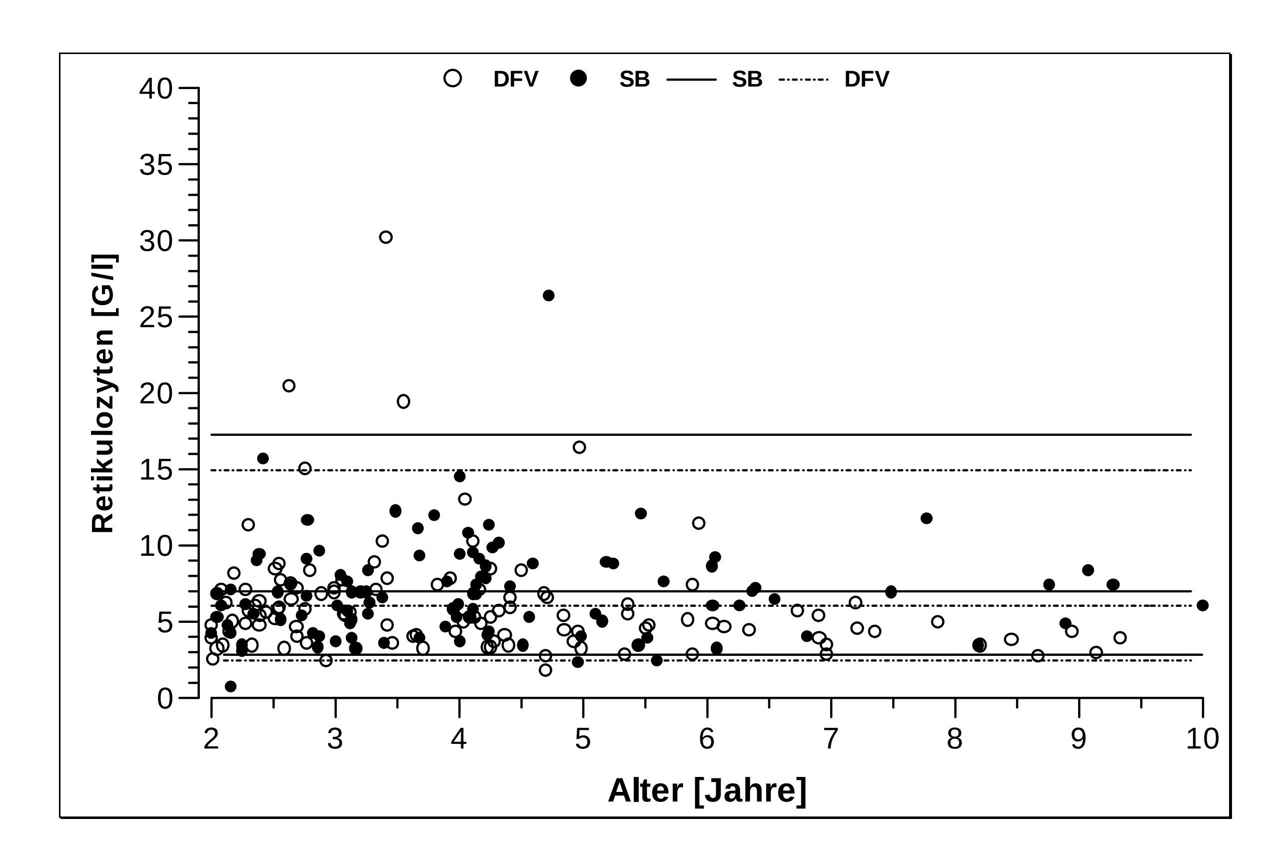


Abb. 49: Altersabhängige Entwicklung der **Retikulozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

	Altersgruppe > 2 Jahre
Regressionsgeraden-gleichung: SB	y = lg0,85
DFV	y = lg0,78
Normbereichsgrenze:	±lg0,39
t-Wert:	1,9714

Signifikanzen :	
Rasseabhängigkeit:	p < 0,05
Altersabhängigkeit:	n.s.
Freiheitsgrade SB:	n = 101
DFV:	n = 111

Für die Parameter MCH, MCHC, RDW und HDW werden in Ergebnisse in den folgenden Tabellen zusammengefaßt. In Tabelle 29 sind die Ergebnisse des t-Test

für den Einfluß der Rasse abgebildet. Tabelle 30 zeigt die Ergebnisse für die Altersabhängigkeit.

Tab. 29: Signifikanzen des Einflusses der Rasse auf die Referenzbereiche für die Altersgruppen kleiner sechs Monate, sechs bis 24 Monate und größer 24 Monate; p = Signifikanz, n.s. = nicht signifikant.

Parameter	**Rinder < 6 Monate**	**Rinder 6 - 24 Monate**	**Rinder > 24 Monate**
MCH	$p < 0,05$	$p < 0,05$	n.s.
MCHC	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,001$
RDW	n.s.	$p < 0,001$	$p < 0,01$
HDW	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,001$

Tab. 30: Signifikanzen des Einflusses des Alters auf die Referenzbereiche für die Altersgruppen kleiner sechs Monate, sechs bis 24 Monate und größer 24 Monate; p = Signifikanz, n.s. = nicht signifikant.

Parameter	**Rinder < 6 Monate**	**Rinder 6 - 24 Monate**	**Rinder > 24 Monate**
MCH	n.s.	$p < 0,001$	$p < 0,001$
MCHC	$p < 0,001$	$p < 0,001$	n.s.
RDW	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,001$
HDW	$p < 0,001$	n.s.	$p < 0,001$

Tab. 31: Zusammenfassung der Regressionsgeradengleichung, Normbereichsgrenze und des t-Wertes der Parameter MCH, MCHC, RDW und HDW, eingeteilt nach Rasse und Altersgruppe.

Mittlerer Hämoglobingehalt MCH:

Regressionsgeraden-		< 6 Monate	6-24 Monate	> 2 Jahre
gleichung: SB	y =	0,75	0,64 + 0,014x	0,97 + 0,001x
DFV	y =	0,75	0,67 + 0,014x	0,97 + 0,001x
Normbereichsgrenze:		±0,089	±0,139	±0,15
t-Wert:		2,0262	1,976	1,976

Mittlere Hämoglobinkonzentration MCHC:

Regressionsgeraden-		< 6 Monate	6-24 Monate	> 2 Jahre
gleichung: SB	y =	20,99 + 0,293x	22,50 + 0,054x	23,31
DFV	y =	20,99 + 0,293x	22,17 + 0,054x	23,00
Normbereichsgrenze:		±1,083	±1,352	±1,431
t-Wert:		2,0262	1,976	1,025

Erythrozytenverteilungsbreite RDW:

Regressionsgeraden-		< 6 Monate	6-24 Monate	> 2 Jahre
gleichung: SB	y =	19,19 + 0,29x	20,40	19,52 - 0,022x
DFV	y =	19,19 + 0,29x	19,66	19,94 - 0,022x
Normbereichsgrenze:		±2,395	±3,075	±2,44
t-Wert:		2,0262	1,976	1,976

Hämoglobinverteilungsbreite HDW:

Regressionsgeraden-		< 6 Monate	6-24 Monate	> 2 Jahre
gleichung: SB	y =	1,71 - 0,043x	1,56	1,49 - 0,001x
DFV	y =	1,71 - 0,043x	1,53	1,51 - 0,001x
Normbereichsgrenze:		±0,16	±0,149	±0,141
t-Wert:		2,0262	1,976	1,976

3.2.6.2 Referenzbereiche für die Parameter der Thrombozytenanalytik

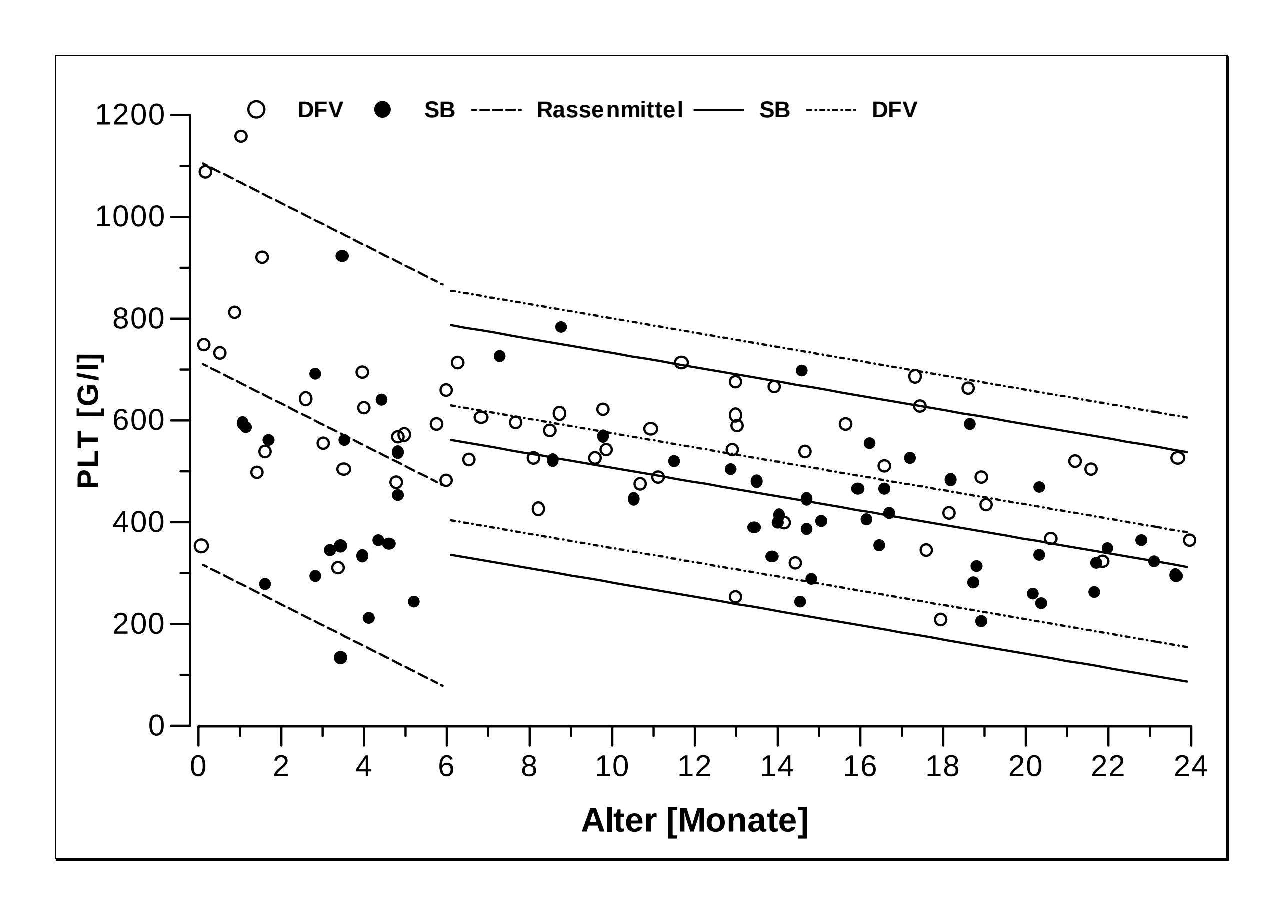


Abb. 50: Altersabhängige Entwicklung der **Thrombozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe < 6 Monate**	**Altersgruppe 6-24 Monate**
	SB	y = 713,0 - 41,0x	y = 647,0 - 14,0x
	DFV	y = 713,0 - 41,0x	y = 714,9 - 14,0x
Normbereichsgrenze:		±394.12	±225,51
t-Wert:		2,0262	1,9908
Signifikanzen:			
Rasseabhängigkeit:		p = 0,05	p < 0,05
Altersabhängigkeit:		p = 0,05	p < 0,001
Freiheitsgrade	SB:	n = 19	n = 41
	DFV:	n = 21	n = 40

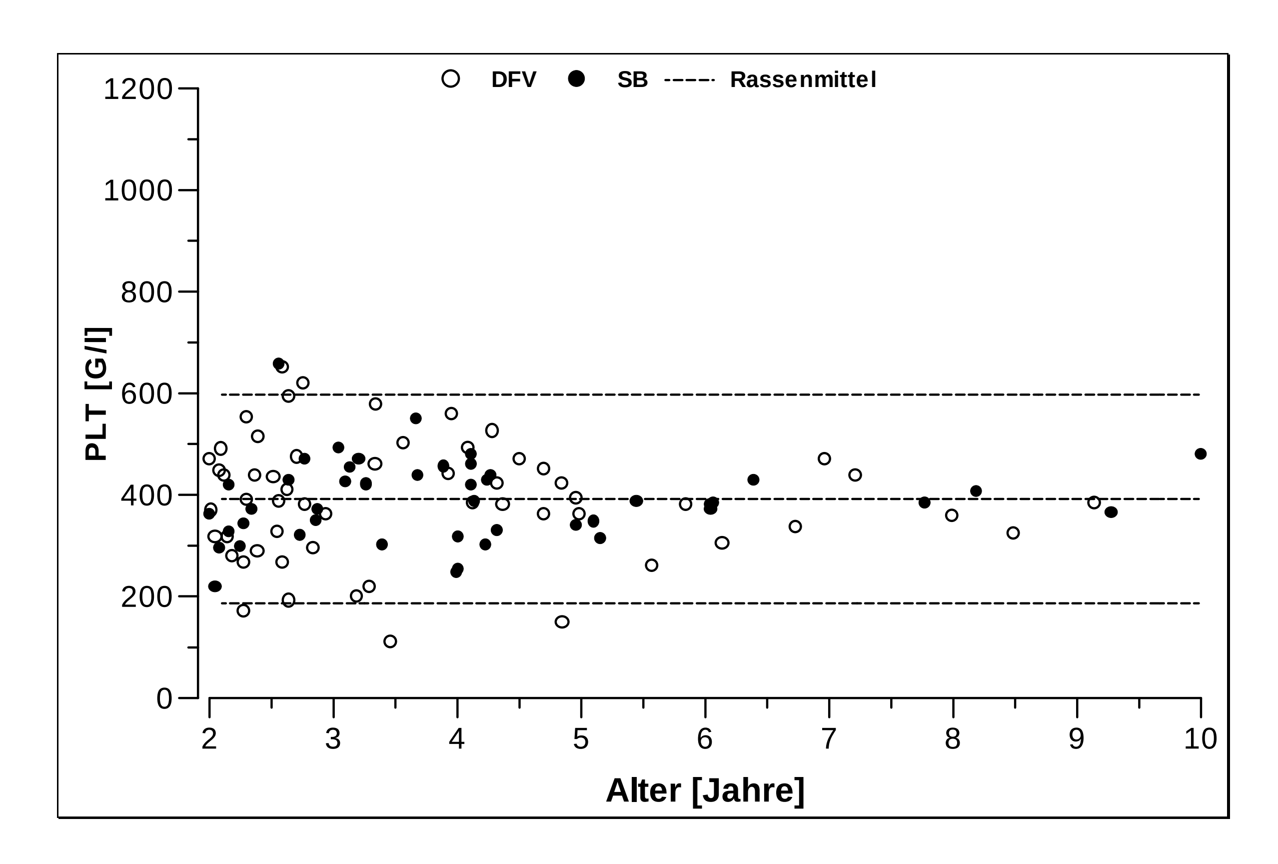


Abb. 51: Altersabhängige Entwicklung der **Thrombozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe > 2 Jahre**
	SB	y = 391,8
	DFV	y = 391,8
Normbereichsgrenze:		±205,28
t-Wert:		1,9837

Signifikanzen :

Rasseabhängigkeit:		n.s.
Altersabhängigkeit:		n.s.
Freiheitsgrade	SB:	n = 47
	DFV:	n = 57

Abbildung 52 und 53 zeigen die Entwicklung des Mittleren Thrombozytenvolumens bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV.

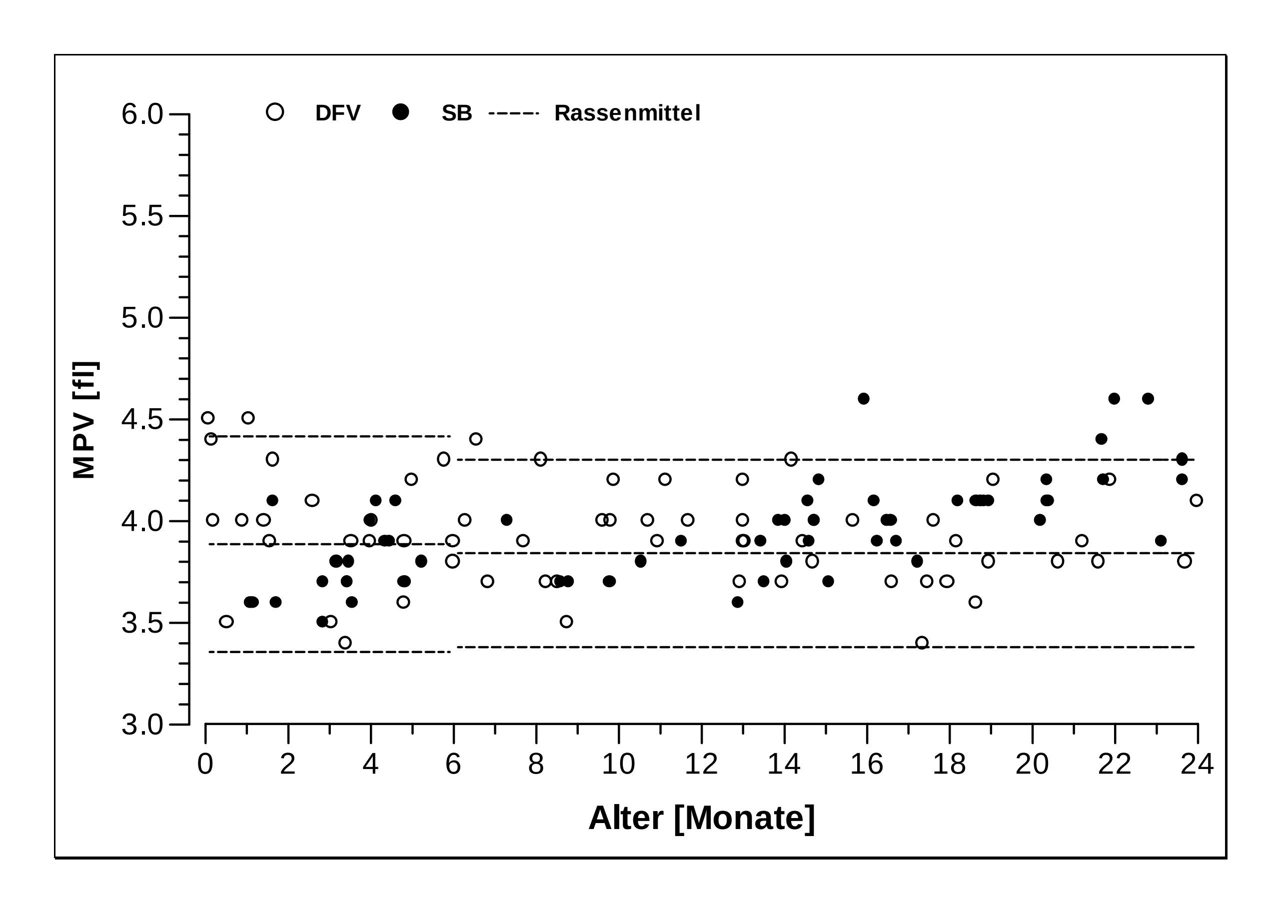


Abb. 52: Altersabhängige Entwicklung des **Mittleren Thrombozytenvolumen** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-		**Altersgruppe < 6 Monate**	**Altersgruppe 6-24 Monate**
gleichung:	SB	y = 3,95	y = 3,83 + 0,012x
	DFV	y = 3,95	y = 3,83 + 0,012x
Normbereichsgrenze:		±0,53	±0,460
t-Wert:		2,0262	1,9908
Signifikanzen:			
Rasseabhängigkeit:		p < 0,05	n.s.
Altersabhängigkeit:		n.s.	p < 0,05
Freiheitsgrade	SB:	n = 19	n = 41
	DFV:	n = 21	n = 40

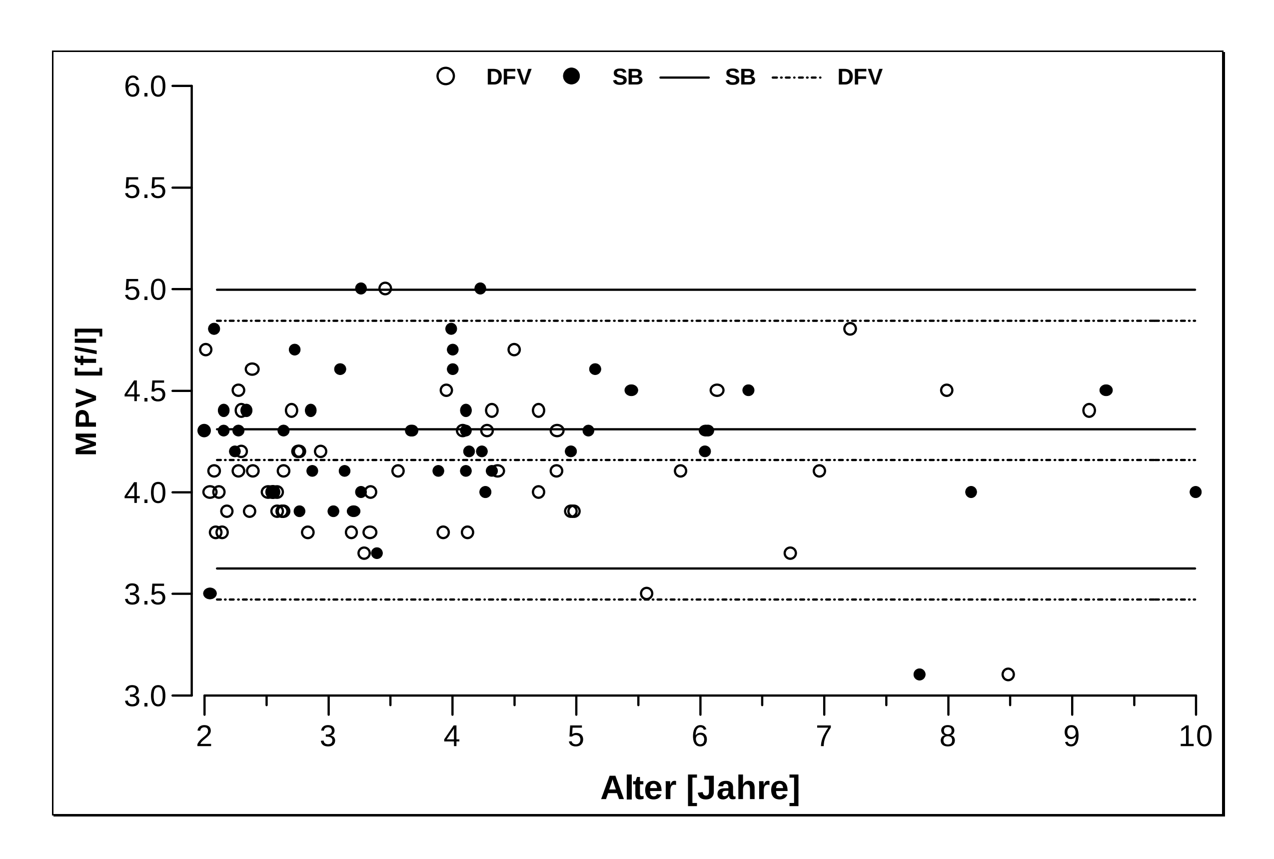


Abb. 53: Altersabhängige Entwicklung des **Mittleren Thrombozytenvolumen** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe > 2 Jahre**
	SB	y = 4,31
	DFV	y = 4,16
Normbereichsgrenze:		±0,69
t-Wert:		1,9837
Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		p < 0,05
Altersabhängigkeit:		n.s.
Freiheitsgrade	SB:	n = 47
	DFV:	n = 57

Abbildung 54 und 55 zeigen die Entwicklung des MPC bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV.

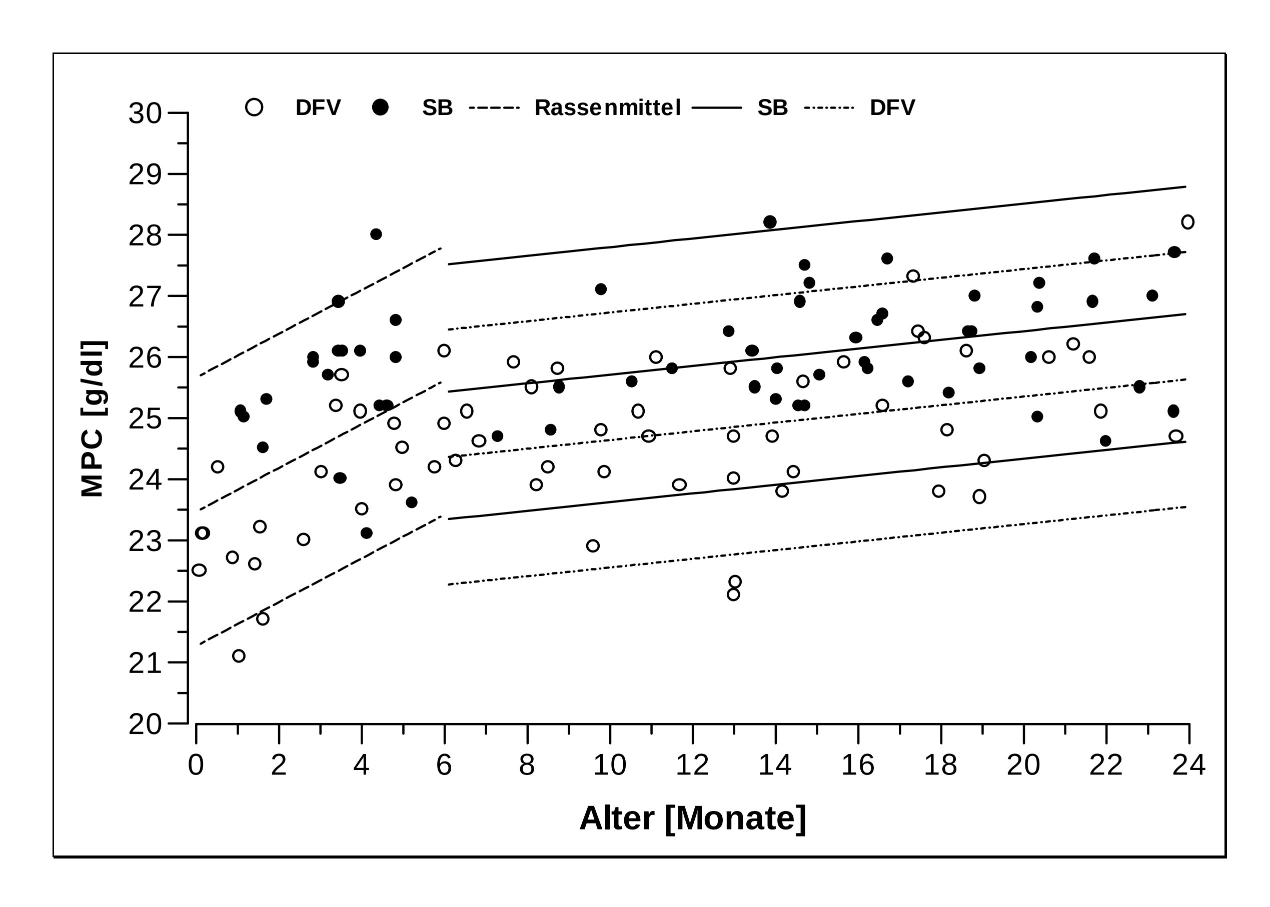


Abb. 54: Altersabhängige Entwicklung der **Mittleren Thrombozytendichte** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

	Altersgruppe < 6 Monate	Altersgruppe 6-24 Monate
Regressionsgeraden-gleichung: SB	y = 23,47 + 0,36x	y = 25,0 + 0,072x
DFV	y = 23,47 + 0,36x	y = 23,93 + 0,072x
Normbereichsgrenze:	±2,20	±2,090
t-Wert:	2,0262	1,9908
Signifikanzen:		
Rasseabhängigkeit:	p < 0,001	p < 0,001
Altersabhängigkeit:	p < 0,001	p < 0,05
Freiheitsgrade SB:	n = 19	n = 41
DFV:	n = 21	n = 40

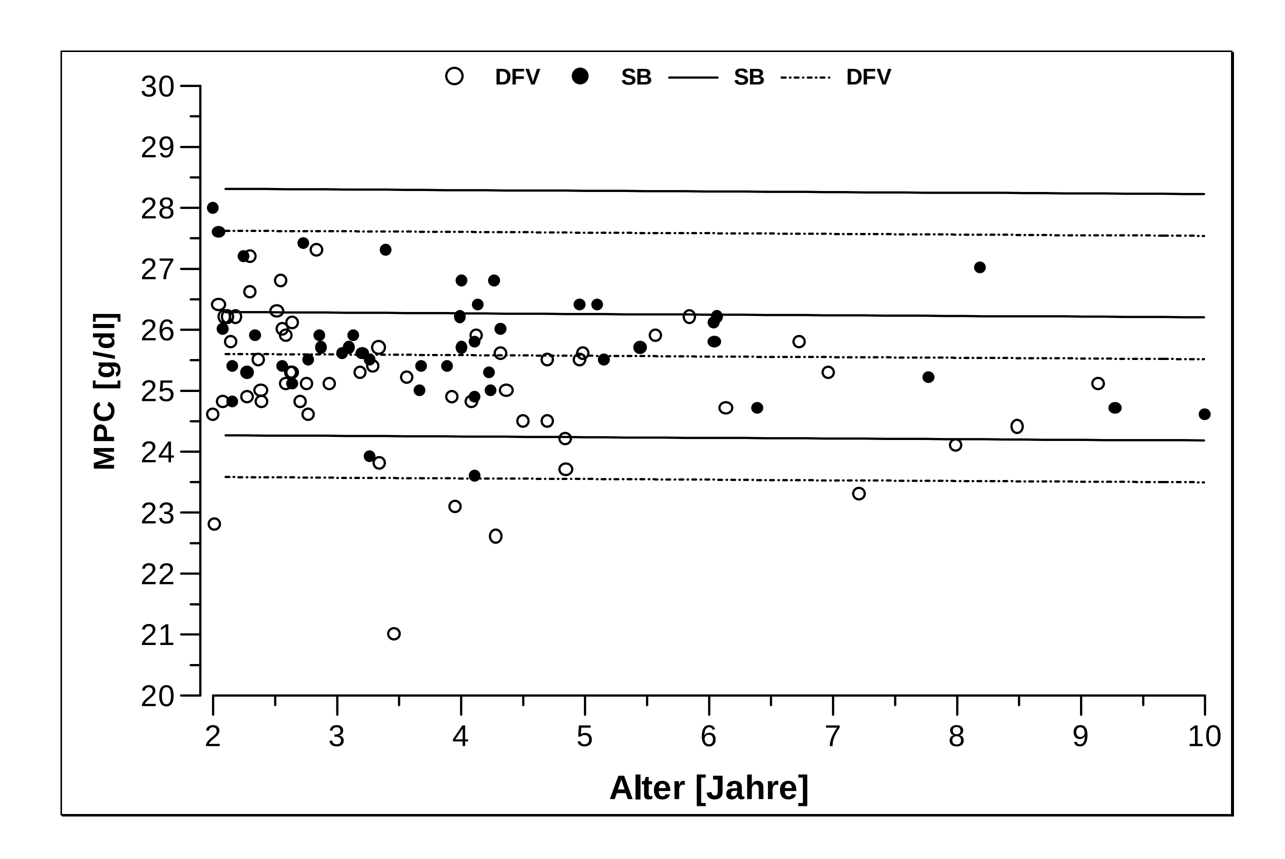


Abb. 55: Altersabhängige Entwicklung der **Mittleren Thrombozytendichte** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

		Altersgruppe > 2 Jahre
Regressionsgeraden-gleichung:	SB	y = 26,31 - 0,01x
	DFV	y = 25,63 - 0,01x
Normbereichsgrenze:		±2,02
t-Wert:		1,9837
Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		p < 0,001
Altersabhängigkeit:		p < 0,05
Freiheitsgrade	SB:	n = 47
	DFV:	n = 57

Abbildung 56 und 57 zeigen die Entwicklung der Mittleren Thrombozytenmasse bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV.

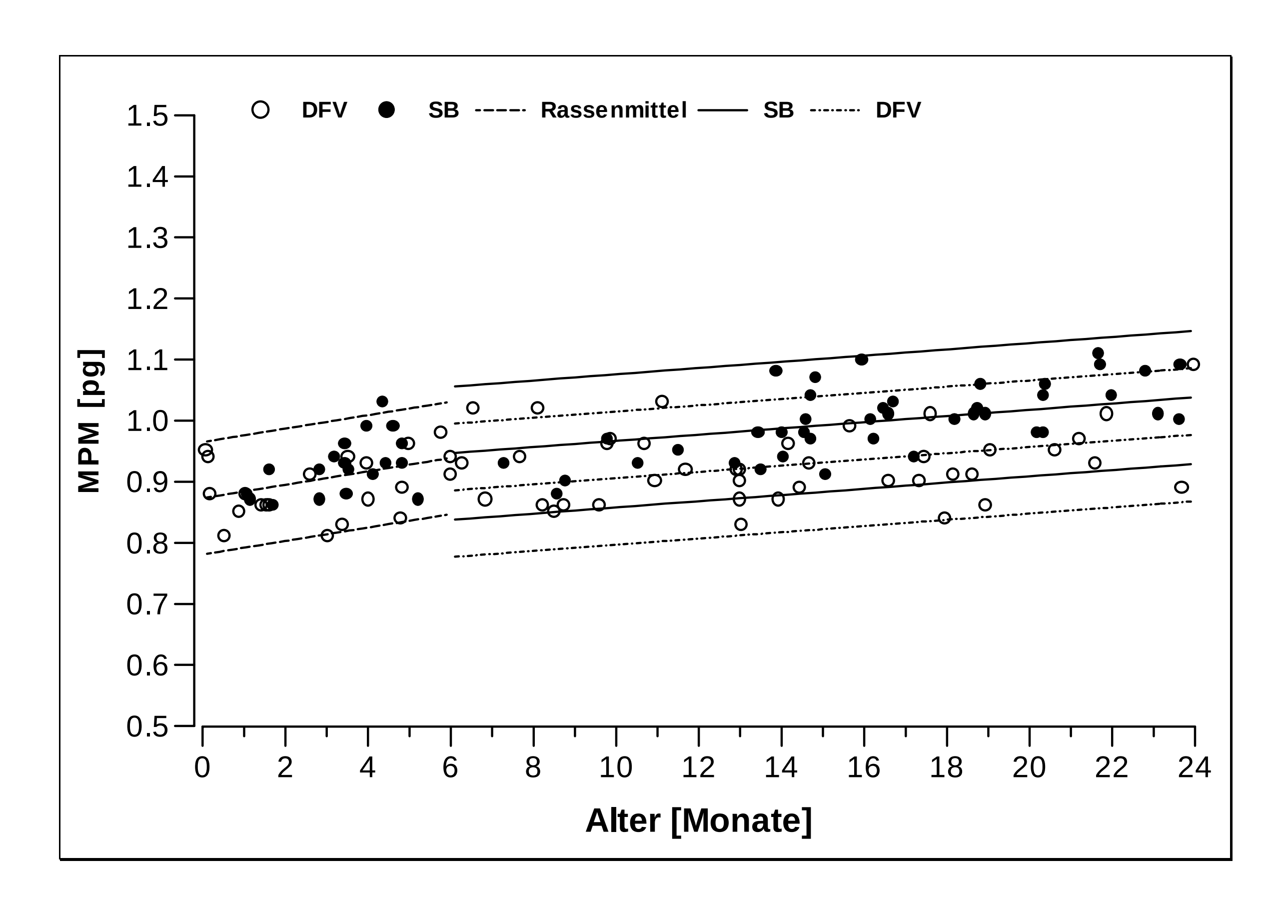


Abb. 56: Altersabhängige Entwicklung der **Mittleren Thrombozytenmasse** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert bis **zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe < 6 Monate**	**Altersgruppe 6-24 Monate**
	SB	y = 0,87 – 0,01x	y = 0,92+0,006x
	DFV	y = 0,87 – 0,01x	y = 0,86+0,006x
Normbereichsgrenze:		±0,09	±0,110
t-Wert:		2,0262	1,9908
Signifikanzen:			
Rasseabhängigkeit:		n.s.	p < 0,001
Altersabhängigkeit:		p < 0,05	p < 0,05
Freiheitsgrade	SB:	n = 19	n = 41
	DFV:	n = 21	n = 40

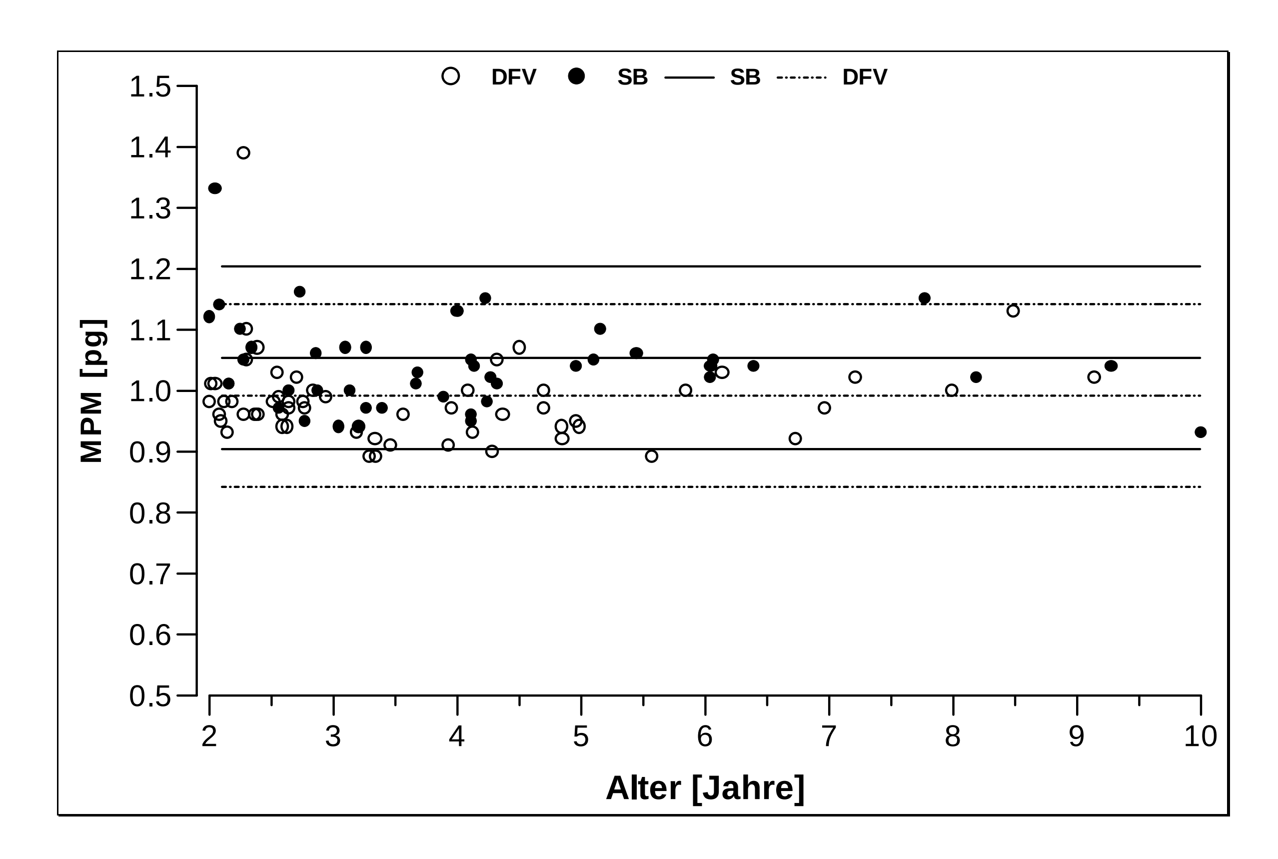


Abb. 57: Altersabhängige Entwicklung der **Mittleren Thrombozytenmasse** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe > 2 Jahre**
	SB	y = 1,05
	DFV	y = 0,99
Normbereichsgrenze:		±0,15
t-Wert:		1,9837
Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		p < 0,001
Altersabhängigkeit:		n.s.
Freiheitsgrade	SB:	n = 47
	DFV:	n = 57

Für die Parameter PDW und PCDW werden die Ergebnisse in den folgenden Tabellen zusammengefaßt. In Tabelle 32 sind die Ergebnisse des t-Test für den Einfluß der Rasse abgebildet. Tabelle 33 zeigt die Ergebnisse für die Altersabhängigkeit.

Tab. 32: Signifikanzen des Einflusses der Rasse auf die Referenzbereiche für die Altersgruppen jünger sechs Monate, sechs bis 24 Monate und älter 24 Monate; p = Signifikanzniveau, n.s. = nicht signifikant.

Parameter	Rinder < 6 Monate	Rinder 6 - 24 Monate	Rinder > 24 Monate
PDW	n.s.	$p < 0,05$	n.s.
PCDW	$p < 0,05$	n.s.	n.s.

Tab. 33: Signifikanzen des Einflusses des Alters auf die Referenzbereiche für die Altersgruppen jünger sechs Monate, sechs bis 24 Monate und älter 24 Monate; p = Signifikanzniveau, n.s. = nicht signifikant.

Parameter	Rinder < 6 Monate	Rinder 6 - 24 Monate	Rinder > 24 Monate
PDW	n.s.	$p < 0,05$	n.s.
PCDW	n.s.	n.s.	$p < 0,001$

Tab.34: Regressionsgeradengleichung, Normbereichsgrenze und t-Wert für die Parameter PDW und PCDW, eingeteilt nach Rasse und Altersgruppe.

Thrombozytenverteilungsbreite:

Regressionsgeraden-		< 6 Monate	6-24 Monate	> 2 Jahre
gleichung: SB	y =	61,0	60,73 + 0,55x	79,88
DFV	y =	61,0	55,64 + 0,55x	79,88
Normbereichsgrenze:		±24,08	±20,16	±26,71
t-Wert:		2,0262	1,9908	1,9837

Verteilungsbreite der Thrombozytendichte:

Regressionsgeraden-		< 6 Monate	6-24 Monate	> 2 Jahre
gleichung: SB	y =	4,88	4,73	4,69 + 0,006x
DFV	y =	4,88	4,73	4,69 + 0,006x
Normbereichsgrenze:		±0,44	±0,58	±0,63
t-Wert:		2,0262	1,9908	1,9837

3.2.6.3 Referenzbereiche für die Parameter des weißen Blutbildes

Abbildung 58 und 59 zeigen die Entwicklung der Leukozytenzahl bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV.

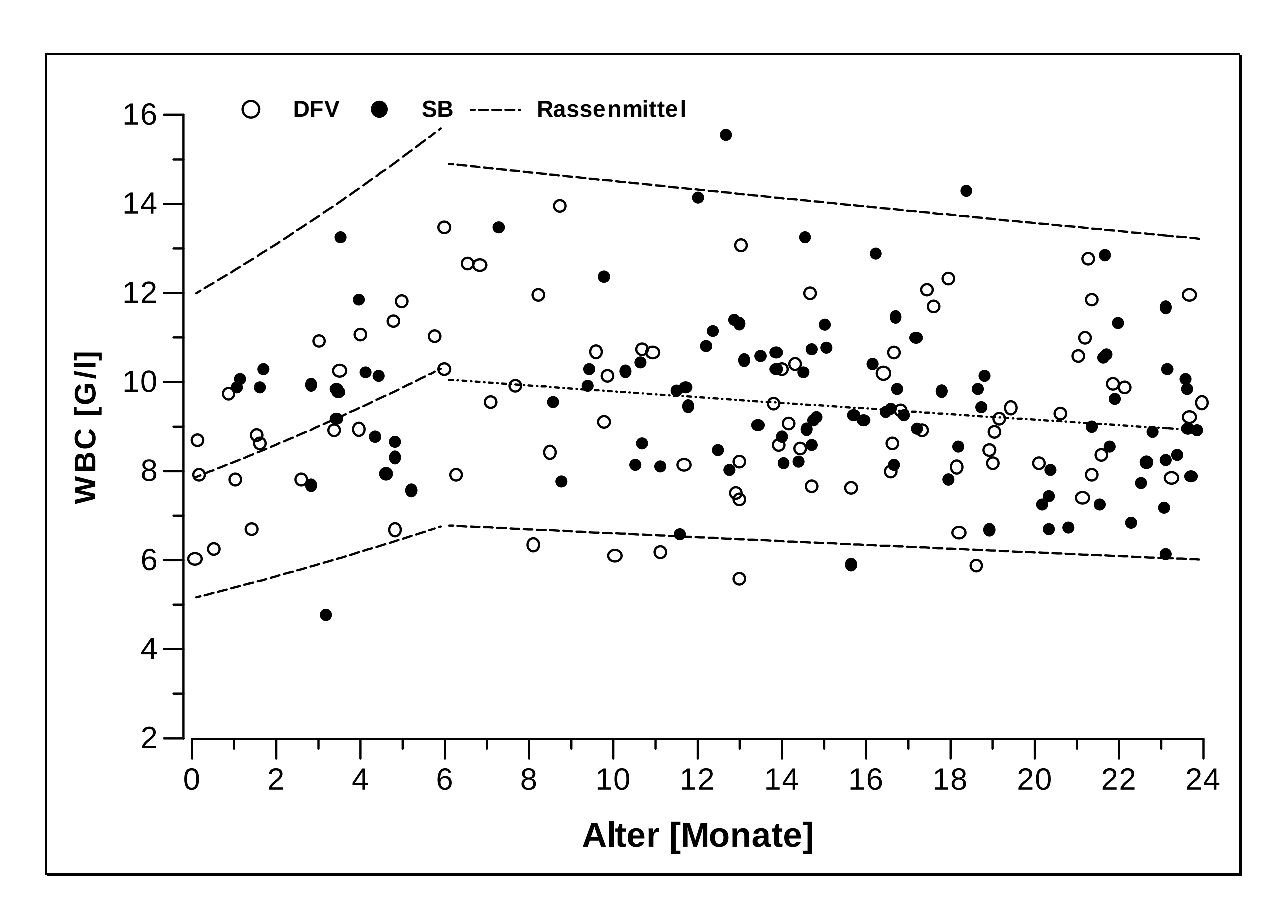


Abb. 58: Altersabhängige Entwicklung der **Leukozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert bis **zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe < 6 Monate**	**Altersgruppe 6-24 Monate**
	SB	y = lg(0,89 + 0,02x)	y = lg(1,02 - 0,003x)
	DFV	y = lg(0,89 + 0,02x)	y = lg(1,02 - 0,003x)
Normbereichsgrenze:		±lg0,183	±lg0,171
t-Wert:		2,0262	1,976
Signifikanzen:			
Rasseabhängigkeit:		n.s.	n.s.
Altersabhängigkeit:		p < 0,05	p < 0,05
Freiheitsgrade	SB:	n = 19	n = 89
	DFV:	n = 21	n = 63

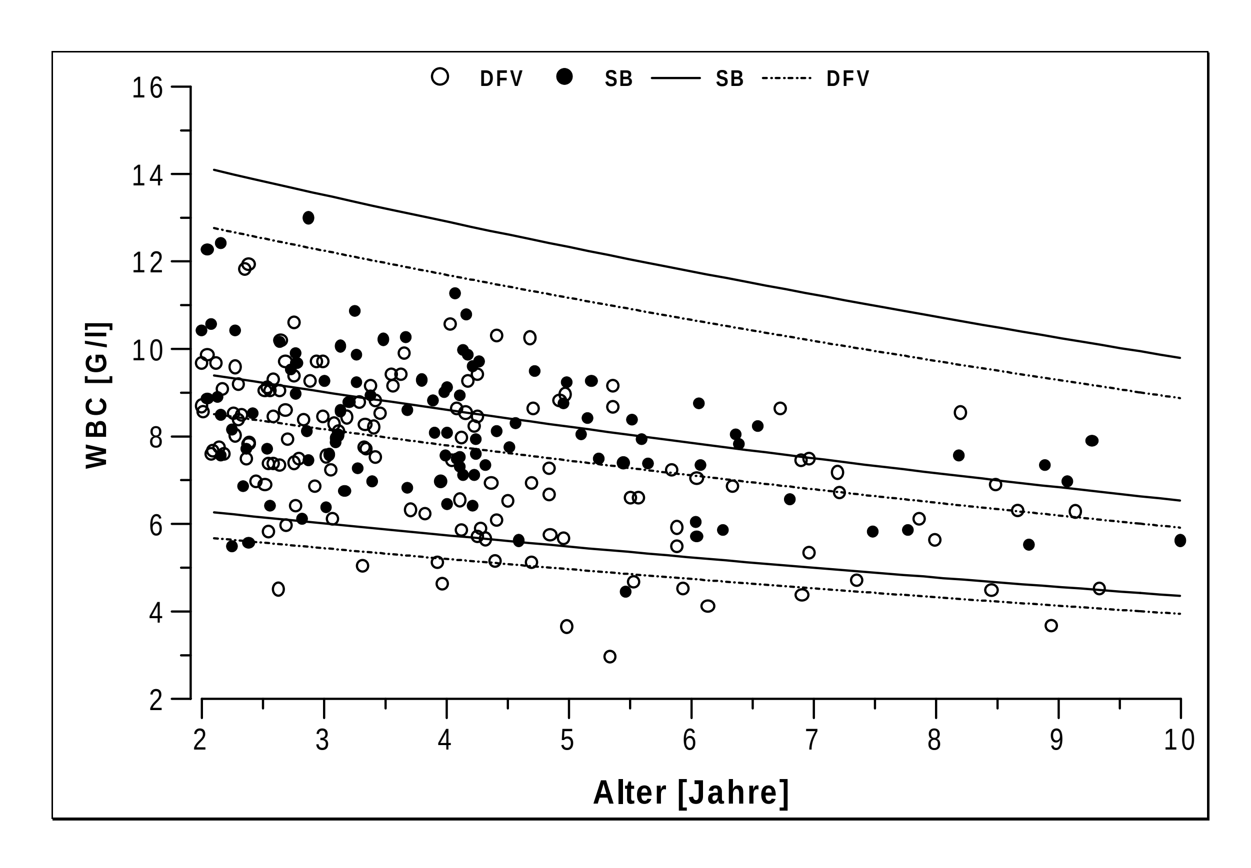


Abb. 59: Altersabhängige Entwicklung der **Leukozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

		Altersgruppe > 2 Jahre
Regressionsgeraden-gleichung:	SB	y = lg(1,015 - 0,002x)
	DFV	y = lg(0,972 - 0,002x)
Normbereichsgrenze:		± lg0,176
t-Wert:		1,97
Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		p < 0,001
Altersabhängigkeit:		p < 0,001
Freiheitsgrade	SB:	n = 105
	DFV:	n = 135

Abbildung 60 zeigt die Entwicklung der neutrophilen Granulozytenzahl in der Altersgruppe 0 – 24 Monate. Auf eine Unterteilung dieser Gruppe konnte aufgrund

fehlender Altersunterschiede verzichtet werden. Abbildung 61 zeigt die Entwicklung für Rinder älter zwei Jahre.

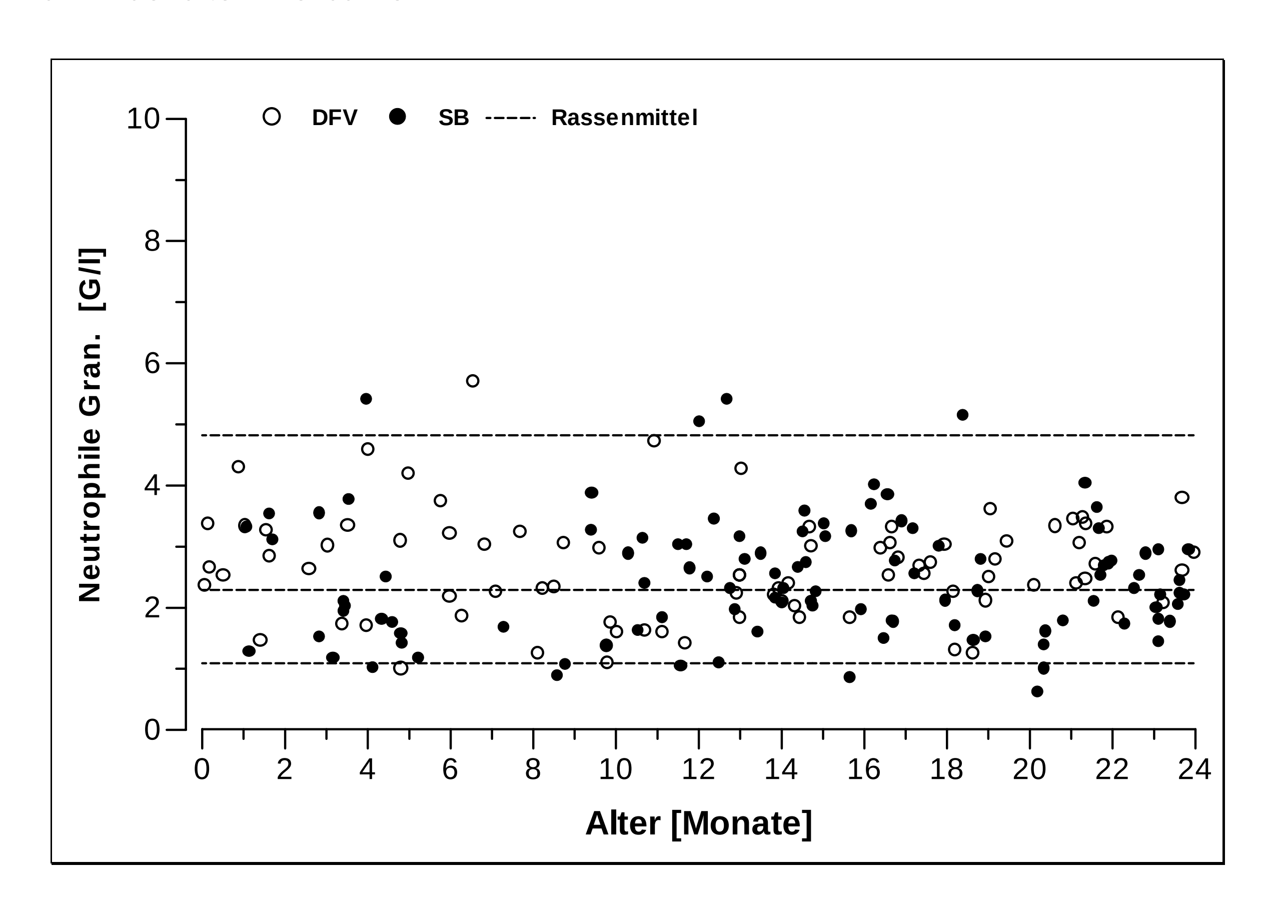


Abb. 60: Altersabhängige Entwicklung der **neutrophilen Granulozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden- gleichung:		**Altersgruppe < 24 Monate**
	SB	y = lg0,36
	DFV	y = lg0,36
Normbereichsgrenze:		±lg0,323
t-Wert:		1,97
Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		p < 0,05
Altersabhängigkeit:		n.s.
Freiheitsgrade	SB:	n = 105
	DFV:	n = 135

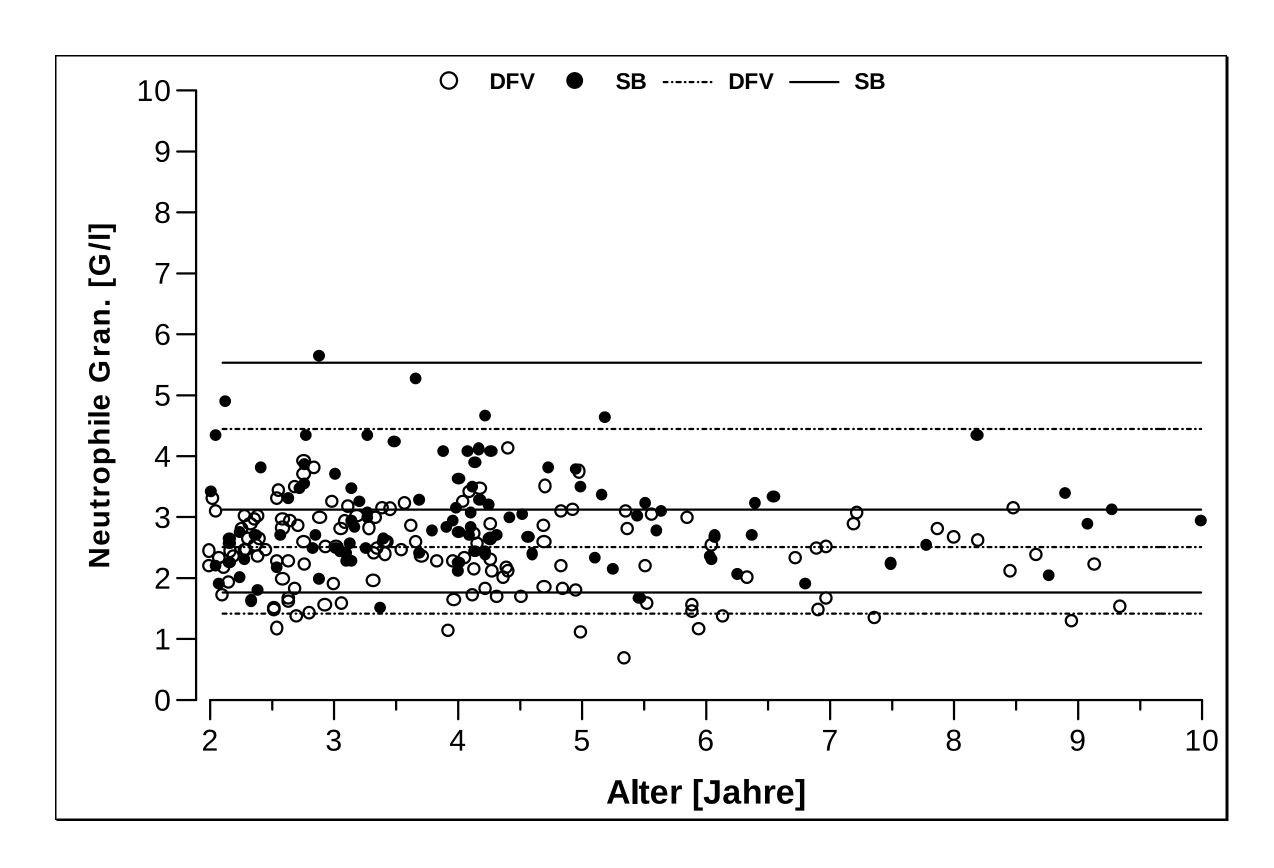


Abb. 61: Altersabhängige Entwicklung der **neutrophilen Granulozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-	**Altersgruppe > 2 Jahre**
gleichung: SB	y = lg0,50 – 0,001
DFV	y = lg0,40 – 0,001
Normbereichsgrenze:	±lg0,25
t-Wert:	1,97

Signifikanzen :	
Rasseabhängigkeit:	p < 0,05
Altersabhängigkeit:	n.s.
Freiheitsgrade SB:	n = 105
DFV:	n = 135

Abbildung 62 und 63 zeigen die Entwicklung der Lymphozytenzahl bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV.

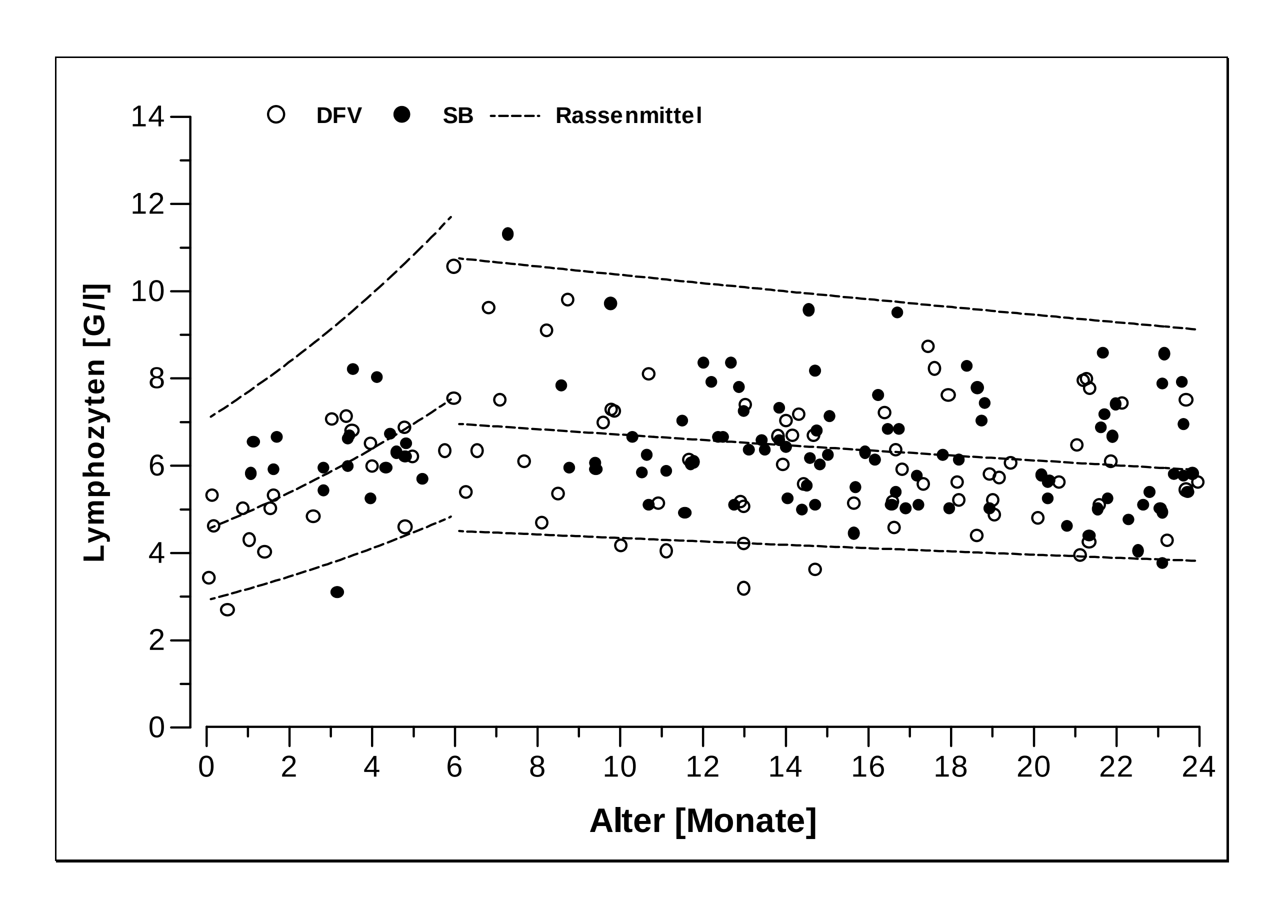


Abb. 62: Altersabhängige Entwicklung der **Lymphozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-		**Altersgruppe < 6 Monate**	**Altersgruppe 6-24 Monate**
gleichung:	SB	y = lg(0,657 + 0,037x)	y = lg(0,867 - 0,004x)
	DFV	y = lg(0,657 + 0,037x)	y = lg(0,867 - 0,004x)
Normbereichsgrenze:		±lg0,192	±lg0,189
t-Wert:		2,0262	1,976
Signifikanzen:			
Rasseabhängigkeit:		n.s.	n.s.
Altersabhängigkeit:		p < 0,001	p < 0,05
Freiheitsgrade	SB:	n = 19	n = 89
	DFV:	n = 21	n = 63

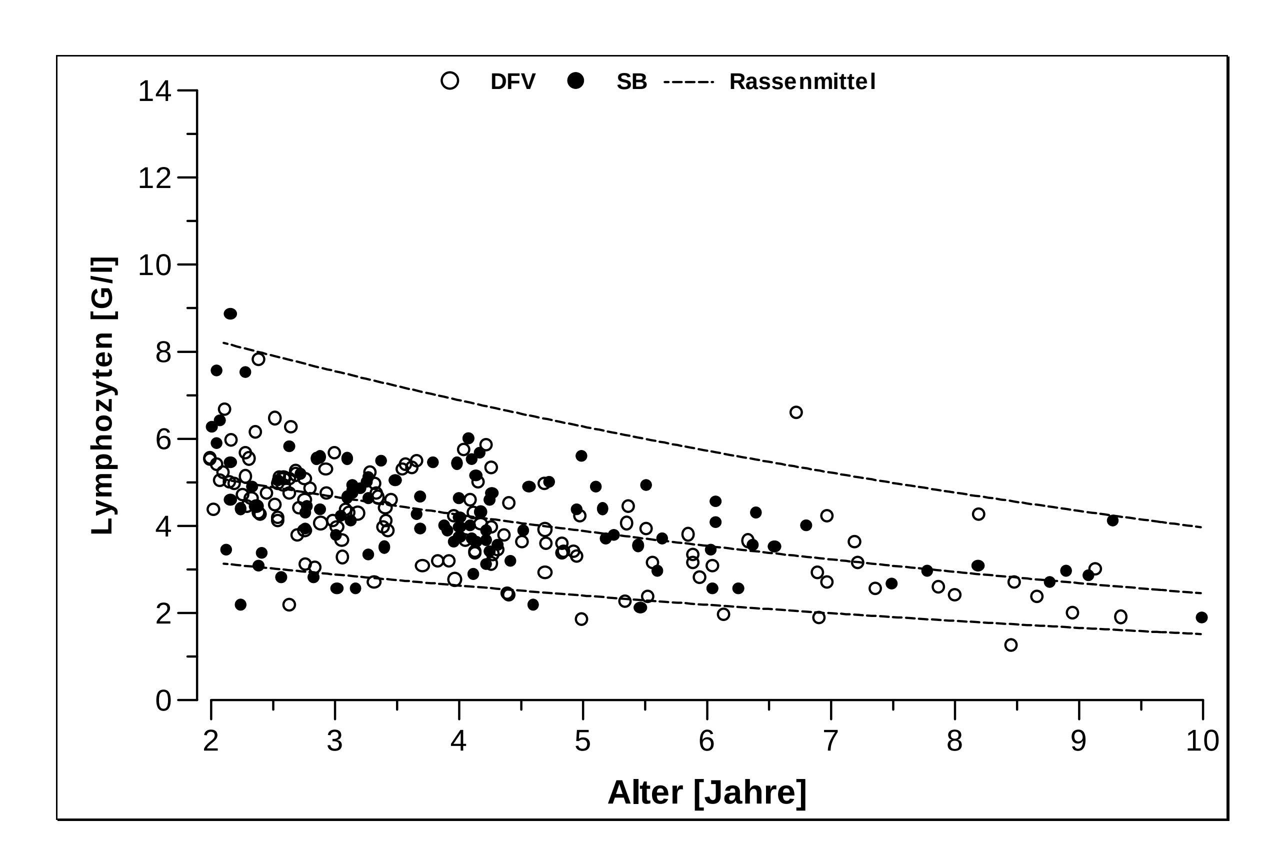


Abb. 63: Altersabhängige Entwicklung der **Lymphozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe > 2 Jahre**
	SB	y = lg(0,789 - 0,004x)
	DFV	y = lg(0,789 - 0,004x)
Normbereichsgrenze:		±lg0,209
t-Wert:		1,97

Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		n.s.
Altersabhängigkeit:		p < 0,001
Freiheitsgrade	SB:	n = 105
	DFV:	n = 135

Abbildung 64 und 65 zeigen die Entwicklung der Monozytenzahl bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV.

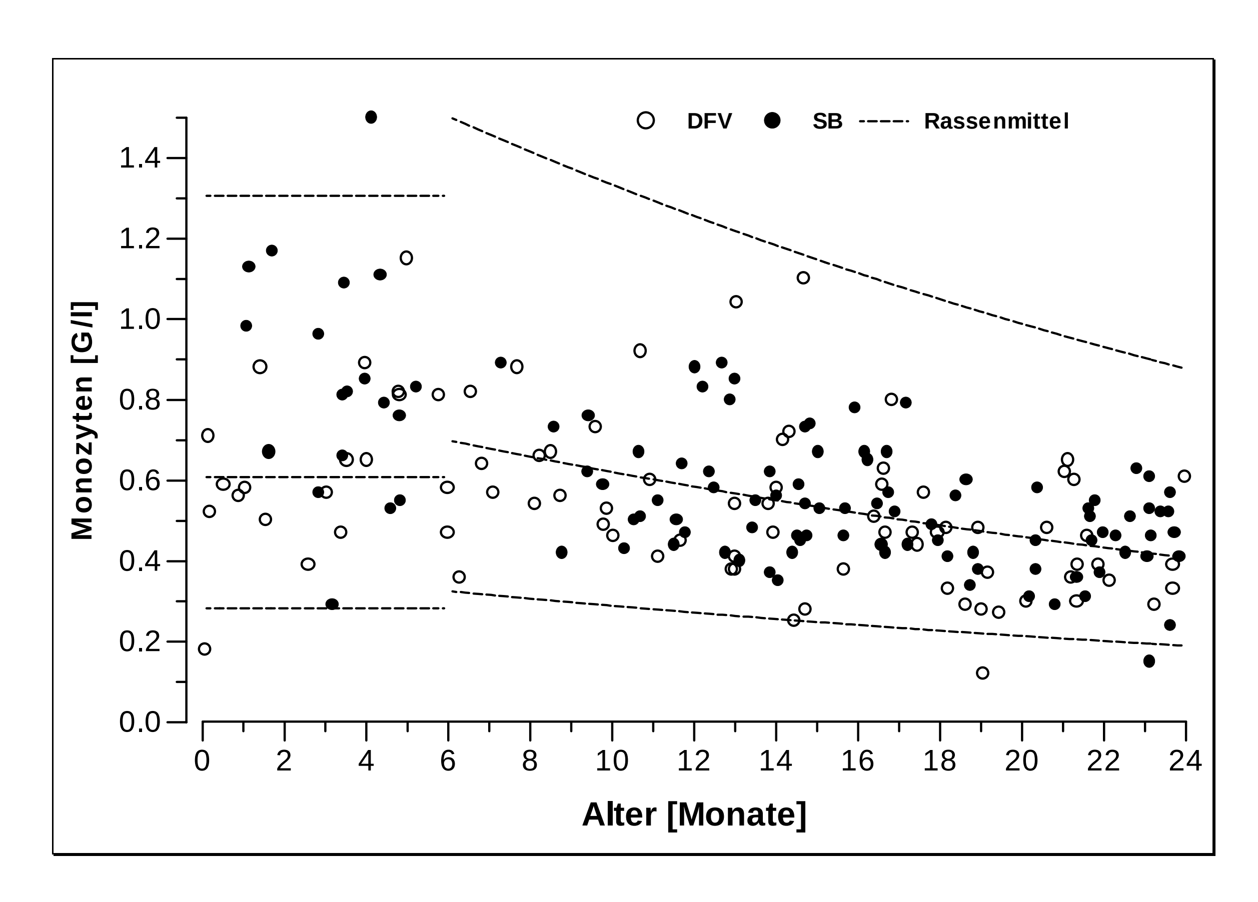


Abb. 64: Altersabhängige Entwicklung der **Monozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe < 6 Monate**	**Altersgruppe 6-24 Monate**
	SB	y = lg-0,216	y = lg(-0,077 – 0,013x)
	DFV	y = lg-0,216	y = lg(-0,077 – 0,013x)
Normbereichsgrenze:		±lg0,332	±lg0,332
t-Wert:		2,0262	1,976
Signifikanzen:			
Rasseabhängigkeit:		p < 0,05	n.s.
Altersabhängigkeit:		n.s.	p < 0,001
Freiheitsgrade	SB:	n = 19	n = 89
	DFV:	n = 21	n = 63

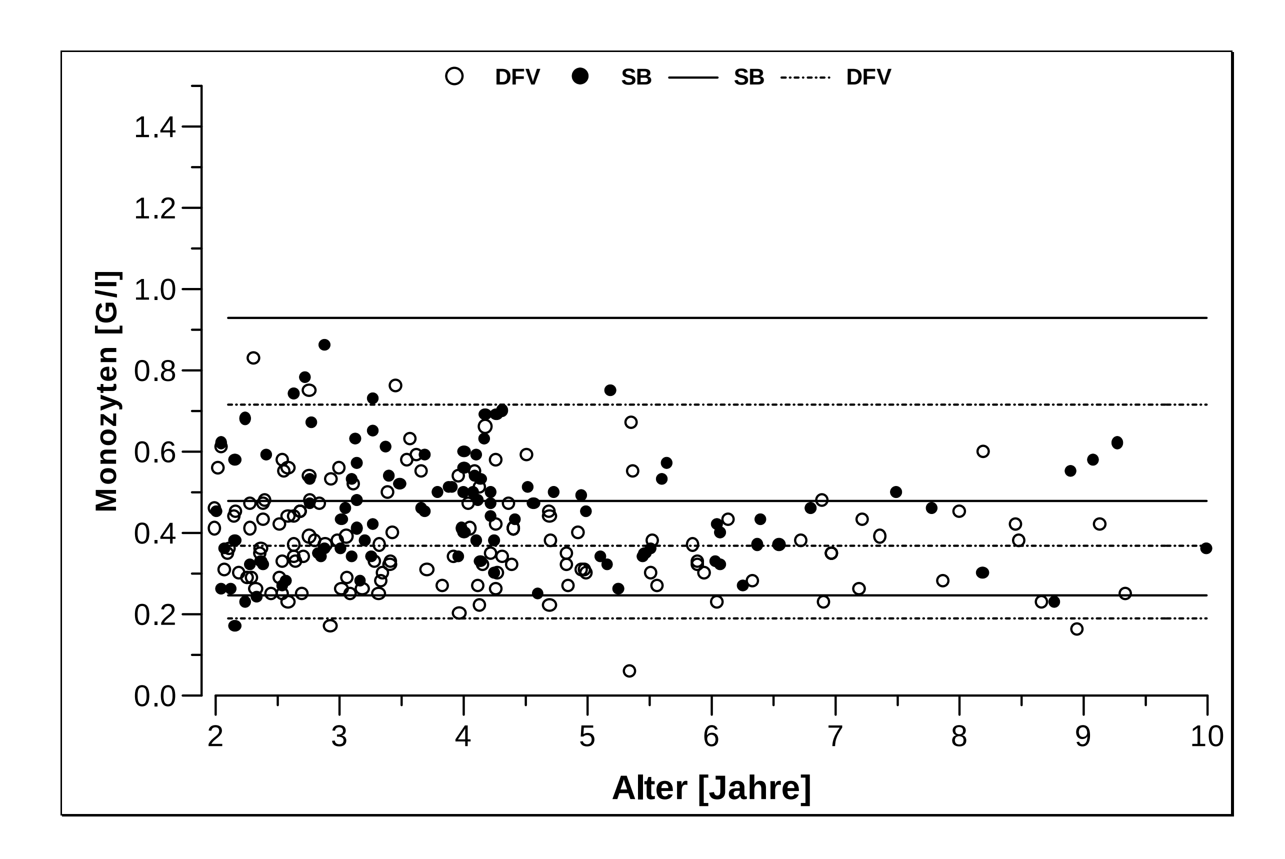


Abb. 65: Altersabhängige Entwicklung der **Monozytenzahl** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-gleichung:		**Altersgruppe > 2 Jahre**
	SB	y = lg-0,32
	DFV	y = lg-0,43
Normbereichsgrenze:		±lg0,288
t-Wert:		1,97
Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		p < 0,001
Altersabhängigkeit:		n.s.
Freiheitsgrade	SB:	n = 105
	DFV:	n = 135

Abbildung 66 und 67 zeigen die Entwicklung der eosinophilen Granulozyten bis zum Alter von 10 Jahren für die Rassen SB und DFV. Eine Unterteilung in der Altersgruppe <24 Monate war hier nicht erforderlich.

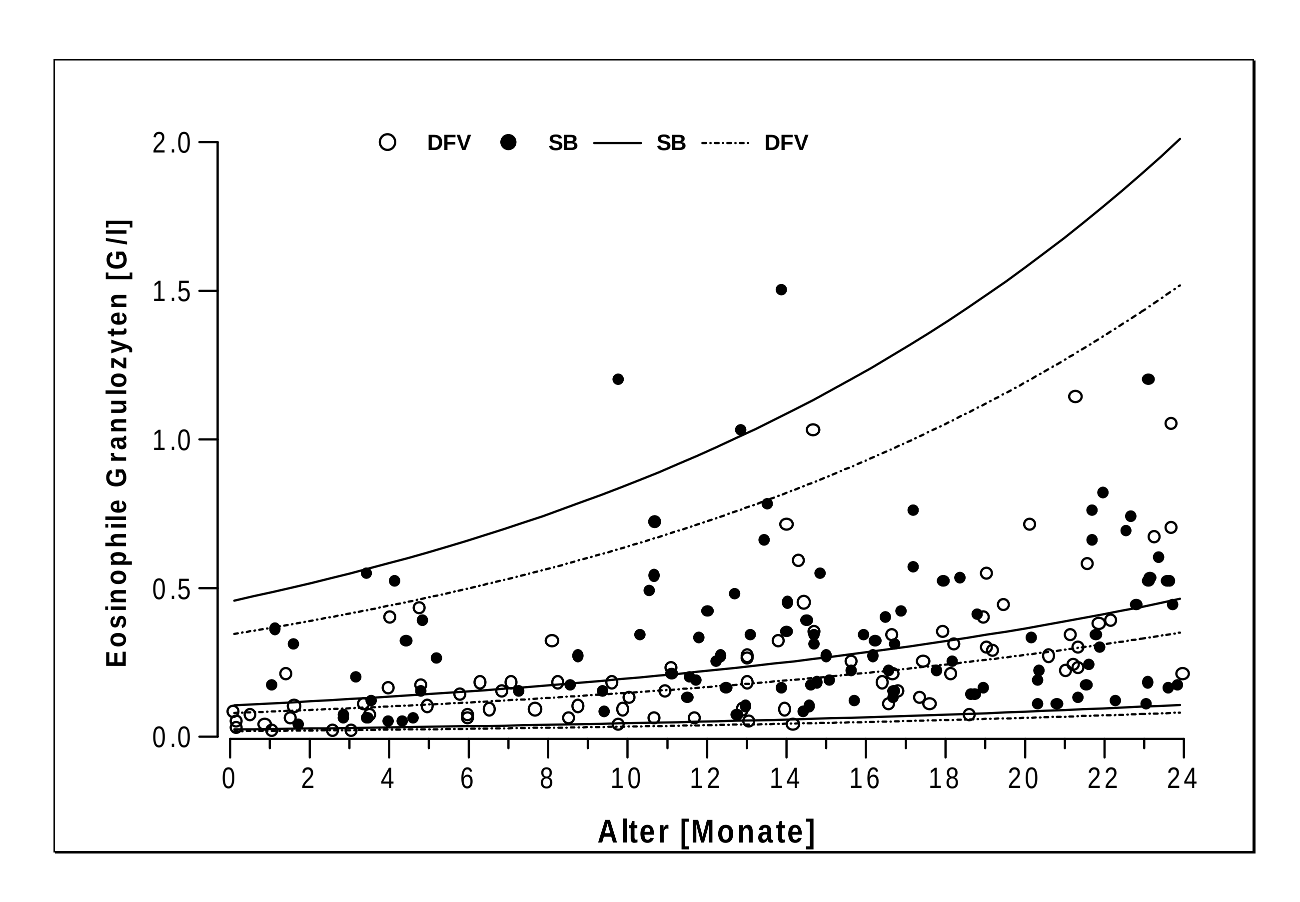


Abb. 66: Altersabhängige Entwicklung der absoluten Zahl der **eosinophilen Granulozyten** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert **bis zum Alter von 24 Monaten.**

Regressionsgeraden-		**Altersgruppe < 24 Monate**
gleichung:	SB	y = lg(-0,979 + 0,027x)
	DFV	y = lg(-1,101 + 0,027x)
Normbereichsgrenze:		±lg0,637
t-Wert:		2,0262
Signifikanzen:		
Rasseabhängigkeit:		p < 0,05
Altersabhängigkeit:		p < 0,001
Freiheitsgrade	SB:	n = 105
	DFV:	n = 135

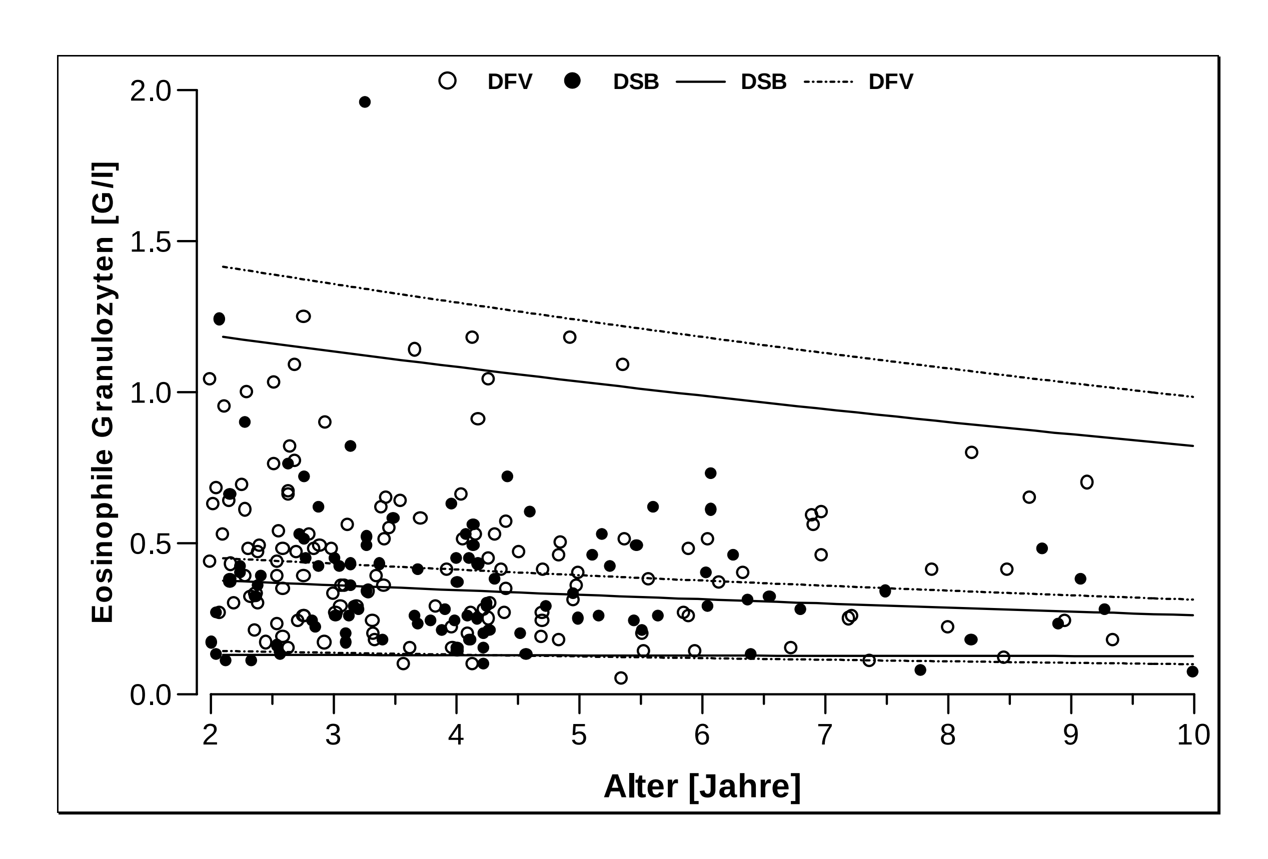


Abb. 67: Altersabhängige Entwicklung der absoluten Zahl der **eosinophilen Granulozyten** für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh. Dargestellt sind Mittelwert sowie oberer und unterer Grenzwert für die **Altersgruppe zwischen zwei und zehn Jahren.**

Regressionsgeraden-		**Altersgruppe > 2 Jahre**
gleichung:	SB	y = lg(-0,382 - 0,002x)
	DFV	y = lg(-0,304 - 0,002x)
Normbereichsgrenze:		±lg0,497
t-Wert:		1,97
Signifikanzen :		
Rasseabhängigkeit:		p < 0,001
Altersabhängigkeit:		n.s.
Freiheitsgrade	SB:	n = 105
	DFV:	n = 135

Die Formeln zur Erstellung der Referenzbereiche für den prozentualen Anteil der Zellpopulationen des Differentialblutbildes werden in den folgenden Tabellen zusammengefaßt. In Tabelle 35 sind die Ergebnisse des t-Test für den Einfluß der Rasse abgebildet. Tabelle 36 zeigt die Ergebnisse für die Altersabhängigkeit.

Tab. 35: Signifikanzen des Einflusses der Rasse auf die Referenzbereiche für die Altersgruppen kleiner sechs Monate, sechs bis 24 Monate bzw. kleiner 24 Monate und größer 24 Monate; p = Signifikanzniveau, n.s. = nicht signifikant.

Parameter	Rinder < 24 Monate	Rinder < 6 Monate	Rinder 6 - 24 Monate	Rinder > 24 Monate
Neutrophile Gran. %	—	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,001$
Lymphozyten %	—	n.s.	n.s.	$p < 0,001$
Eosinophile Gran. %	n.s.	—	—	$p < 0,001$
Monozyten %	$p < 0,05$	—	—	n.s.

Für die Zählung der eosinophilen Granulozyten und der Monozyten kann, wie in Tabelle 36 ersichtlich, kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe < 6 Monate und der Gruppe 6 – 24 Monate festgestellt werden. Daher erfolgt die Berechnung eines Referenzwertes für beide Gruppen gemeinsam.

Tab. 36: Signifikanzen des Einflusses des Alters auf die Referenzbereiche für die Altersgruppen kleiner sechs Monate, sechs bis 24 Monate bzw. kleiner 24 Monate und größer 24 Monate; p = Signifikanzniveau, n.s. = nicht signifikant.

Parameter	Rinder < 24 Monate	Rinder < 6 Monate	Rinder 6 – 24 Monate	Rinder > 24 Monate
Neutrophile Gran. %	—	$p < 0,05$	n.s.	$P < 0,001$
Lymphozyten %	—	$P < 0,001$	n.s.	$P < 0,001$
Eosinophile Gran. %	$p < 0,001$	—	—	n.s.
Monozyten %	$p < 0,001$	—	—	$p < 0,001$

Tab. 37: Regressionsgeradengleichung, Normbereichsgrenze und t-Wert der prozentualen Blutzelldifferenzierung, eingeteilt nach Rasse und Altersgruppe.

Neutrophile Granulozyten [%]:

	< 6 Monate	**6 - 24 Monate**	**> 2 Jahre**
Regressionsgeraden-gleichung: SB y =	32,33 – 2,91x	21,01 + 0,22x	30,43 + 0,12x
DFV y =	32,33 – 2,91x	27,04 + 0,22x	30,43 + 0,12x
Normbereichsgrenze:	±15,78	±13,32	±12,65
t-Wert:	2,0262	1,976	1,976

Lymphozyten [%]:

	< 6 Monate	**6-24 Monate**	**> 2 Jahre**
Regressionsgeraden-gleichung: SB y =	55,89 + 2,25x	67,91 - 0,21x	58,66 - 1,14x
DFV y =	55,89 + 2,25x	64,47 - 0,21x	58,66 - 1,14x
Normbereichsgrenze:	±14,07	±13,58	±13,31
t-Wert:	2,0262	1,976	1,976

Eosinophile Granulozyten [%]:

	<24 Monate	**> 2 Jahre**
Regressionsgeraden-gleichung: SB y =	lg(0,979 - 0,027x)	lg0,60
DFV y =	lg(1,101 - 0,027x)	lg0,60
Normbereichsgrenze:	±lg0,245	±lg0,47
t-Wert:	1,9726	1,976

Monozyten [%]:

	<24 Monate	**> 2 Jahre**
Regressionsgeraden-gleichung: SB y =	lg(0,91 - 0,01x)	lg(0,66 - 0,001)
DFV y =	lg(0,91 - 0,01x)	lg(0,66 - 0,001)
Normbereichsgrenze:	±lg0,245	±lg0,24
t-Wert:	1,9726	1,976

4 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Bei der Untersuchung von Patientenblut mit Hämatologiesystemen wird primär nur die physikalische Eigenschaft des Blutes, insbesondere seiner Blutzellen, erfaßt. Erst durch eine Datenverknüpfung oder Analogie kann aus diesen Eigenschaften ein hämatologischer Meßwert abgeleitet werden. Kein Gerät ist in der Lage, Blutkörperchen zu "erkennen", sondern es werden elektrische und/oder optische Signale gezählt und differenziert (THOM, 1990).
Bevor also ein Analysator in den klinischen Einsatz geht ist eine ausführliche Validierung seiner Spezifikationen und Meßergebnisse erforderlich. Durch technische Neuerungen werden dem Benutzer des ADVIA 120 eine reihe bisher unbekannter Parameter zur Thrombozyten-, Retikulozyten- und Erythrozytenanalytik bereitgestellt. Diese neuen Parameter verfügen zur Zeit über keine klinische Bedeutung. Daher werden zweiten Teil dieser Arbeit für neue Parameter Referenzbereiche erstellt, um eine Grundlage für die klinischen Bewertung und Einsatzfähigkeit zu geben. Gleichzeitig werden auch für bekannte Parameter Referenzbereiche erstellt, die zum Teil aufgrund von verbesserter Meßmethoden oder in Folge veränderter Haltungs- und Umweltbedingungen von den bisherigen Referenzbereichen abweichen.

4.1.1 Evaluierung und Softwareadaptation des ADVIA 120

Die Evaluation des ADVIA 120 teilt sich in vier Schritte (Softwareversion 1-4). Die Umsetzung erforderlicher Veränderungen an der Software für die einzelnen Tierarten zur Verbesserung der Meßgenauigkeit, wurde durch Mitarbeiter von Bayer Diagnostics Tarrytown NY durchgeführt. Die einzelnen Softwareversionen werden in den nächsten Kapitel parallel verglichen und vorgestellt. Die Bewertung der Gerätetauglichkeit erfolgt anhand der Softwareversion 4 (V.1.1.04-MS), die eine Zulassung für den deutschen und amerikanischen Markt erhalten hat. Als erstes werden die Ergebnisse des ADVIA 120 mit denen der Referenzmethoden verglichen, danach folgt die Beurteilung der Präzision sowie der Vergleich verschiedener Antikoagulanzien und der Einfluß der Lagerungsdauer und Lagertemperatur von Blutproben auf die Ergebnisse des ADVIA 120. Abschließend erfolgt die Feststellung von Linearität und Verschleppung für den ADVIA 120.

4.1.2 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich dient der Überprüfung der Richtigkeit der Meßergebnisse des ADVIA 120. Hierzu wurden die Ergebnisse der Referenzmethoden denen des ADVIA 120 gegenübergestellt (s. a. Kapitel 2.4). Zunächst erfolgt der Vergleich der Parameter der Blutzellzählung, anschließend wird mit einem Beispiel auf die Meßgenauigkeit der Retikulozytenanalytik eingegangen, und zum Schluß des folgenden Kapitels werden die Ergebnisse der Blutzelldifferenzierung mit den manuell ermittelten Ergebnissen verglichen.

Von den Parametern der **Blutzellzählung** konnten für den WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH und PLT zwischen ADVIA 120 und H*1 (vgl. Tabelle 16) Übereinstimmungen mit einer exzellenten Korrelation ($r = 0,99$) ermittelt werden. Eine nur unbedeutend niedrigere Korrelation mit $r = 0,87$ wurden für den MCHC gefunden. Im Vergleich des ADVIA 120 mit dem F-800 (Widerstandsmessprinzip) wurden sehr gute Korrelationskoeffizienten zwischen $r = 0,869$ und 0,997 ermittelt (vgl. Tabelle 17). Aus der Literatur (vgl. Tabelle 38) sind ähnlich gute Ergebnisse für den Technicon H*1 und den Cell-Dyn® 3500 für das Schaf bzw. für das Rind bekannt (Bleul, 1998; BEDDIES, 1999; GROMMELT, 1999). Die Messung des Hämatokritwertes mit dem ADVIA 120 korreliert mit den Ergebnissen der Zentrifuge mit $r = 0,975$ ebenfalls gut.

Das mittlere Plättchenvolumen (MPV) korreliert nur mäßig mit den Referenzmethoden ($r < 0,6$). Die Ursache hierfür liegt in der überlegenen 2D-Thrombozytenanalyse des ADVIA 120 (s. a. Kapitel 3.1.1.2.5). Diese Technik ermöglicht es, neben dem Ausschluß von Zelltrümmern und kleinen Erythrozyten von den Thrombozytenzahlen, eine exakte Volumenmessung der Thrombozyten vorzunehmen (KOSANKE, 1999). Hierin zeigt der ADVIA 120 einen deutlichen Vorteil gegenüber den Referenzgeräten, der durch interne Plausibilitätskontrollen einen hohen Standard an diagnostischer Sicherheit.

Tab. 38: Korrelationskoeffizienten ausgewählter Parameter der Blutzellzählung für Geräteevaluationen mit den Tierarten Rind und Schaf nach Literaturangaben

Autor Analysator Referenz-gerät Spezies:	Bleul (1998) Cell-Dyn® 3500 Kammer-zählung Rind	Beddies (1999) Technicon H*1 Sysmex F-800 Schaf	Grommelt (1999) Technicon H*1 Sysmex F- 800 Rind	Eigene Untersuchungen ADVIA 120 Technicon H*1 Rind
WBC	r = 0,960	r = 0,916	r = 0,976	r = 0,997
RBC	r = 0,859	r = 0,793	r = 0,880	r = 0,993
PLT	r = 0,706	r = 0,718	r = 0,840	r = 0,990
HCT	r = 0,968*	r = 0,862	r = 0,808	r = 0,993

*Referenzgerät Hämatokritzentrifuge

Beim Vergleich der **Retikulozytenzählung** mittels ADVIA 120 mit der Zählung der Retikulozyten in einem mit Brilliantkresylblau gefärbtem Ausstrich konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden. Die Ursache hierfür ist die physiologischerweise geringe Zahl an Retikulozyten im zirkulierendem Blut beim Rind, sowie die geringe Anzahl der manuell gezählten Zellen (1000 Zellen pro Ausstrich), im Gegensatz zu 50 000 bis 60 000 untersuchten Zellen pro Messung bei der automatischen Zählung durch den ADVIA 120. Auf der anderen Seite ist es durch die sensitive Meßtechnik möglich, Erythrozyten mit geringem RNA-Gehalt den Retikulozyten zuzuordnen.
Beim klinischen Einsatz an anämischen Patienten zeigte sich, daß der ADVIA 120 in diagnostisch relevanten Bereichen einsetzbar ist (vergleiche auch Kapitel: 3.1.1.2.6). Auf den Abbildungen 68, 69, 70 ist eine Zusammenstellung der Erythrozyten- und Retikulozytenmessergebnisse dargestellt. Bei dem Patienten handelt es sich um ein ca. 18 Monate altes weibliches Rind der Rasse Deutsch Rotbunt mit einer regenerativen Anämie. Zum Zeitpunkt der Untersuchung beträgt

der Hämatokritwert 0,087 L/L, und die Erythrozytenzahl ist auf 1 T/l abgefallen. Die Zahl der im Blut zirkulierenden Retikulozyten liegt bei 162,2 G/l (16 %).

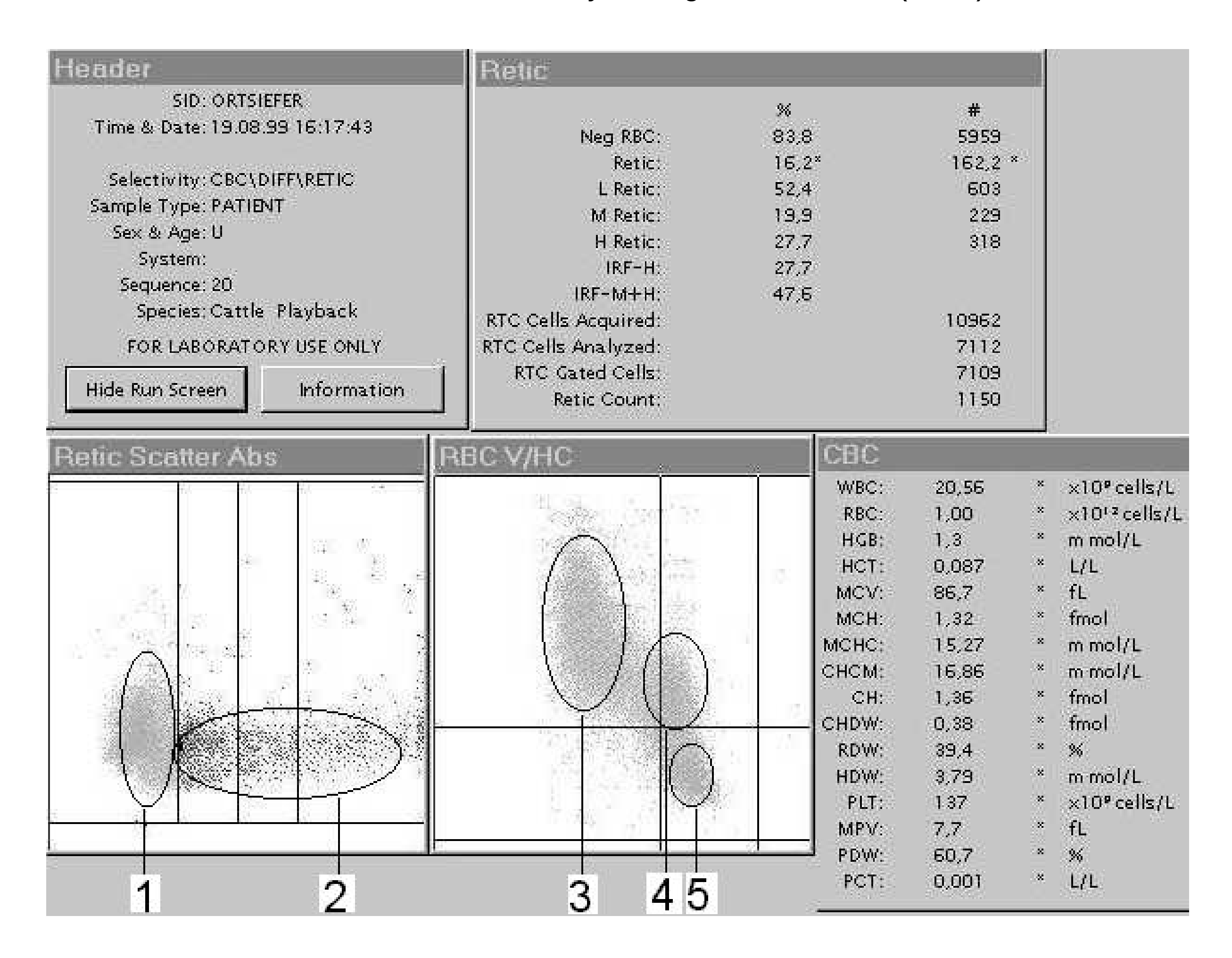


Abb. 68: Ergebnis des ADVIA 120 für die Erythrozyten- und Retikulozytenzählung bei einem Rind mit regenerativer Anämie.

Auf der Abbildung 68 ist im Retikulozytenzytogramm die Population der Retikulozyten mit **2** (Retic Count) gekennzeichnet. Diese Gruppe umfaßt Retikulozyten mit geringem (L RETIC), mittlerem (M RETIC) und hohem (H RETIC) Gehalt an Ribonukleinsäure; links im Anschluß an die Retikulozyten folgt die Population der reifen Erythrozyten (1= Neg RBC). Die Zellen aus Gruppe **1** und **2** bilden zusammen die Gruppe der „Klassifizierten Zellen" (RTC Gated Cells). Die Berechnung des prozentualen Anteils der Retikulozyten erfolgt nach der Formel:

Retikulozyten % = 100 x (Retikulozyten ÷ Klassifizierte Zellen) x kal. Faktor

Bei dem kal. Faktor handelt es sich um einen gerätespezifischen Kalibrationsfaktor. Aus dem prozentualen Anteil der Retikulozyten und der Erythrozytengesamtzahl (RBC) wird die absolute Anzahl der Retikulozyten berechnet. Die Angabe der Retikulozytengesamtzahl erfolgt in % und G/l.

Des weiteren kann der Abbildung 68 die Erythrozytenmorphologie entnommen werden. Die Gewinnung der Blutprobe erfolgte ca. 30 Minuten nach einer Bluttransfusion mit 1 Liter Vollblut. Die Population der normochromen, normozytären Spendererythrozyten ist mit der Nummer **5** gekennzeichnet. Die Zellgruppen **2** und **3** beschreiben die hypochromen bis normochromen, makrozytären Zellen des Empfängertieres.

Im Verlauf der Regeneration wurden nach 12 und 26 Tagen Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind auf den Abbildungen 69 und 70 zu entnehmen. Auf Abbildung 69 zeigt sich eine geringe Erhöhung der Erythrozytenzahlen auf 1,28 T/l, die Zahl der Retikulozyten beträgt 284,8 G/l (22,3 %). Der Hämatokritwert ist auf 0,108 L/L angestiegen.

Die Erythrozytenmorphologie ist im Vergleich zur ersten Untersuchung kaum verändert. Zu diesem Zeitpunkt ist die Population der Spendererythrozyten nicht mehr vorhanden, so daß keine normozytären, normochromen Erythrozyten vorliegen.

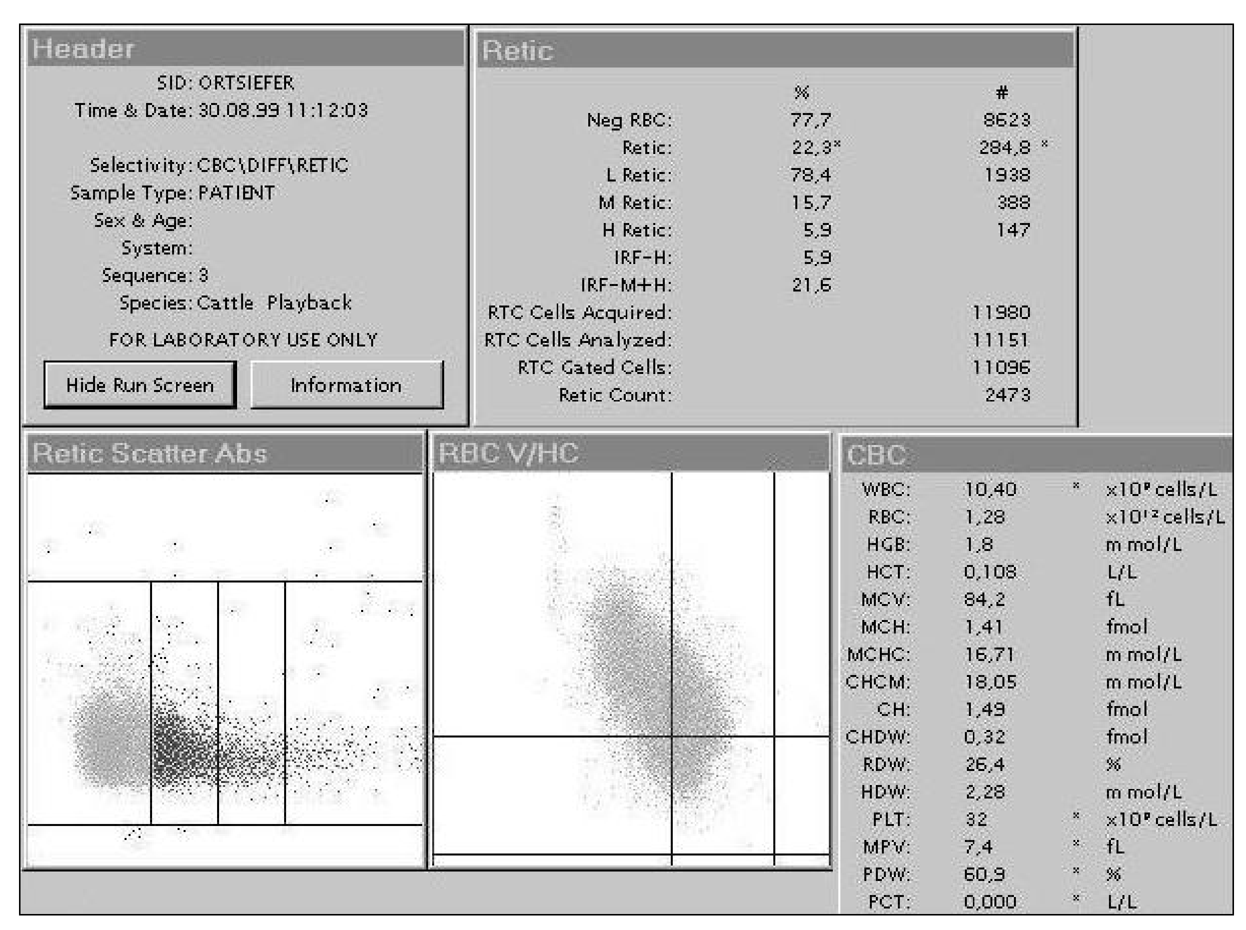


Abb. 69: Ergebnis des ADVIA 120 für die Erythrozyten- und Retikulozytenzählung bei einem Rind mit regenerativer Anämie. Der Untersuchungszeitpunkt liegt 12 Tage nach der ersten Messung.

Die Abbildung 70 auf der nun folgenden Seite zeigt den Zustand 26 Tage nach der ersten Messung. Die Retikulozyten sind nahezu nicht mehr vorhanden (1,8 G/l; 0,1 %). Der Hämatokritwert ist auf 0,161 L/L angestiegen, und die Erythrozytenzahl ist auf 2,81 T/l angestiegen. Die Erythrozytenmorphologie zeigt noch ein geringgradig hypochromes, makrozytäres Verteilungsbild. Zu diesem Zeitpunkt werden nur noch reife Erythrozyten aus dem Knochenmark entlassen.

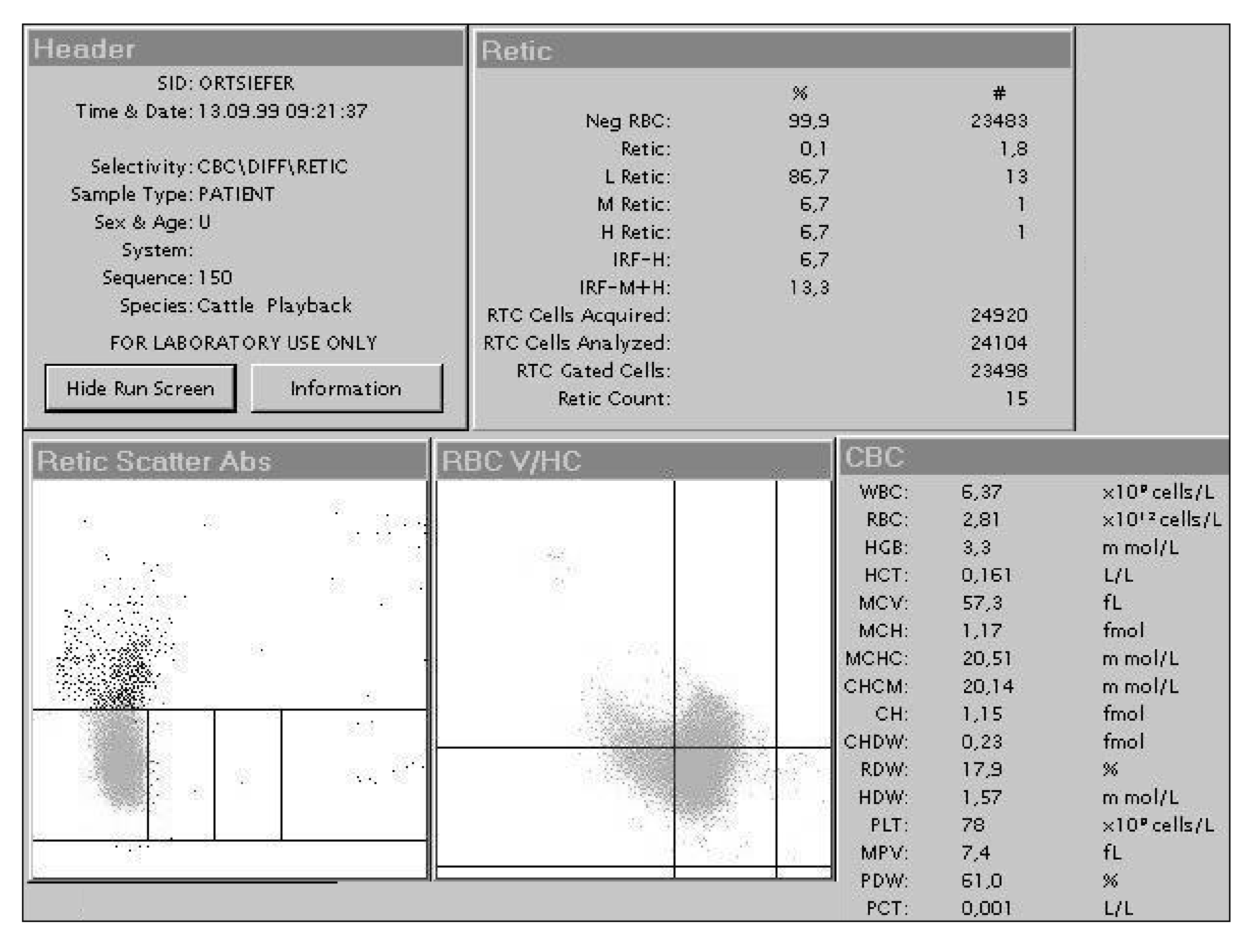


Abb. 70: Ergebnis des ADVIA 120 für die Erythrozyten- und Retikulozytenzählung bei einem Rind mit regenerativer Anämie. Der Untersuchungszeitpunkt liegt 26 Tage nach der ersten Messung.

An diesem Beispiel läßt sich anschaulich darstellen, daß der ADVIA 120 in der Lage ist, in klinisch relevanten Fällen Retikulozyten beim Rind zu detektieren. Des weiteren ist eine sichere und schnelle Aussage über die Regenerationsfähigkeit von Anämiepatienten zu machen. Dabei erleichtert die Art der Datenaufbereitung in Form von Histogrammen und die routinemäßige Beschreibung der Erythrozytenmorphologie die schnelle Auswertung und in der Folge die Einleitung von Sofortmaßnahmen zur Therapie eines Anämiepatienten. Es wäre zu wünschen, daß diese anschauliche Art der Informationsdarstellung jedem Untersuchungsbericht neben den reinen Zahlenwerten zur Verfügung steht. Leider sieht die Praxis in den meisten Großlabors noch anders aus.

Die Qualität der **Blutzelldifferenzierung** ist eine entscheidende Eigenschaft des Hämatologiesystems. Ein zuverlässiges automatisch erstelltes Differentialblutbild reduziert den Arbeitsaufwand und damit die Kosten jeder Untersuchung. Die Richtigkeit der Blutzelldifferenzierung des ADVIA 120 wurde durch Differenzierung von 593 Ausstrichen ermittelt. Tabelle 39 zeigt die Ergebnisse für verschiedene Analysatoren für das Rind und das Schaf.

Tab. 39: Korrelationskoeffizienten zwischen mikroskopisch und automatisch erstellten Differenzialblutbilder für Rind und Schaf nach Literaturangaben

Autor: **Analysator:** **Spezies:** **Parameter** **Färbung**		**Bleul (1998)** **Cell-Dyn® 3500** **Rind**	**Beddies (1999)** **Technicon H*1** **Schaf**	**Grommelt (1999)** **Technicon H*1** **Rind**	**Eigene Untersuchung** **ADVIA 120** **Rind**
Neutrophile Granulozyten	PAN POX ANAE	r = 0,971 r = - r = -	r = 0,945 r = 0,954 r = 0,944	r = 0,949 r = 0,949 r = 0,945	r = 0,945 r = 0 925 r = 0,962
Lymphozyte n	PAN POX ANAE	r = 0,935 r = - r = -	r = 0,943 r = 0,950 r = 0,950	r = 0,939 r = 0,945 r = 0,936	r = 0,895 r = 0,916 r = 0,938
Monozyten	PAN POX ANAE	r = 0,761 r = - r = -	r = 0,244 r = 0,364 r = 0,529	r = 0,234 r = 0,140 r = 0,265	r = 0,395 r = 0,410 r = 0,509
Eosinophile Granulozyten	PAN POX ANAE	r = 0,876 r = - r = -	r = 0,921 r = 0,911 r = 0,905	r = 0,882 r = 0,869 r = 0,875	r = 0,798 r = 0,770 r = 0,657
Basophile Granulozyten	PAN POX ANAE	r = 0,088 r = - r = -	r = - r = - r = -	r = 0,441 r = 0,326 r = -0,01	r = 0,152 n.b. n.b.

– keine Angaben

Die Übereinstimmung des automatisch erstellten Differentialblutbildes des ADVIA 120 mit der manuellen Blutzelldifferenzierung mittels Peroxidase-, Panoptischen- und α-Naphtylacetat-Esterase-gefärbten Blutaustrichen ist für die Erkennung der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten sehr gut. Der Korrelationskoeffizient rangiert zwischen r = 0,895 und r = 0,962, wobei die Ergebnisse für die neutrophilen Granulozyten etwas besser korrelieren als die der Lymphozyten. Die Richtigkeit bei der Differenzierung dieser Zellgruppen erbrachte auch in anderen Evaluationen ähnliche gute Ergebnisse (BEDDIES, 1999; GROMMELT, 1999; BLEUL, 1998).
Deutlich schlechter fällt das Ergebnis für die Differenzierung der eosinophilen Granulozyten aus. Dieses ist um so erstaunlicher, da diese Population im Peroxidasezytogramm (s. Abb. 08) des ADVIA 120 ein genau definiertes Kluster bildet. Die Korrelationskoeffizienten von r = 0,657 (ANAE) bis r = 0,798 (PAN) lassen sich nur durch die geringe Zahl von eosinophilen Granulozyten in bovinen Blutproben erklären. Aufgrund der geringen Anzahl von Zellen kommt es zu starken statistischen Schwankungen, sowohl bei der automatischen wie auch bei der manuellen Differenzierung. Bei einem hohen Anteil eosinophiler Granulozyten am Differentialblutbild ist die automatische Differenzierung der manuellen überlegen. Von verschiedenen Autoren werden ähnliche Probleme beschrieben (GROMMELT, 1999; RÜMKE, 1960; TVEDTEN u. KORCAL, 1979). HABERMANN et al. (1989) belegten die Überlegenheit der automatischen eosinophilen Granulozytenzählung gegenüber der manuellen Differenzierung. Bei der Bestimmung der Richtigkeit der Zählung der basophilen Granulozyten ergaben sich keine signifikanten Übereinstimmungen mit den Referenzverfahren.
Die Differenzierung der Monozyten bereitet bei der manuellen Differenzierung beim Rind insoweit Schwierigkeiten, als daß eine exakte Unterscheidung großer Lymphozyten von Monozyten nicht immer möglich ist. Die Problematik liegt in dem Fehlen einer geeigneten Referenzmethode zur exakten Identifikation (GOOSSENS et al., 1991). Durch den Einsatz der ANAE-Färbung kann die Identifizierung erleichtert werden. Beim Methodenvergleich korreliert die ANAE-Färbung mit r = 0,509 am besten mit den Ergebnissen des ADVIA 120, gefolgt von der POX-Färbung mit r = 0,410. Die schlechteste Übereinstimmung besteht zur PAN-Färbung mit r = 0,396. GROMMELT (1999) erhielt bei der Evaluation des H*1 vergleichbare Korrelationen für die Monozytenzählung - nachdem er die Gruppe der LUC zur

Monozytenfraktion addierte. BEDDIES (1999) konnte mit dem H*1 aufgrund der fehlenden Softwareeinstellung für das Schaf keine ausreichende Richtigkeit der Messungen feststellen.

4.1.3 Präzision

Die Meßpräzision des ADVIA 120 wird anhand von zwei Meßreihen ermittelt. Die Präzision innerhalb der Serie wird durch eine 25-fach Wiederholungsmessung ermittelt. Die Präzision über verschiedene Serien hinweg wird durch 3-fach Messung aller Evaluationsblutproben bestimmt. Die Abschätzung des Zufallsfehlers und damit die Reproduzierbarkeit von Untersuchungsergebnissen ist eine unabdingbare Voraussetzung bei der korrekten Blutzellzählung (WESTGARD et al., 1974). Moderne Hämatologiesysteme sollten über einen Variationskoeffizienten von $\leq$ 3 % bei Wiederholungsmessungen verfügen (DÖRNER et al., 1993).

Für die Parameter der Blutzellzählung ergibt sich für den ADVIA 120 ein Variationskoeffizient bei der Messung über verschiedene Serien hinweg von CV = 0,59 % (RDW) bis CV = 2,26 % (WBC) (vergl. auch. Tabelle 22). Damit liegt dieser für die Parameter WBC,RBC, RDW, HGB, HCT, MCV, MCH und MCHC deutlich unter der 3 %-Marke. Ein wenig schlechter ist die Präzision für die Thrombozyten mit 3,60 %. Beim Vergleich dieser Werte mit den Ergebnissen von GROMMELT (1999) für das Rind: WBC = 4,9 %, RBC = 1,2 % und PLT = 3,4 % und BEDDIES (1999) für das Schaf: WBC = 4,5 %, RBC = 1,1 % und PLT = 4,2 % zeichnet sich der ADVIA 120 durch eine deutlich bessere Präzision der Ergebnisse aus. Eine Ausnahme bildet hier die Zählung der Retikulozyten, für die eine Abweichung von 37,87 % zwischen den einzelnen Messungen berechnet wurde.

Die Variationskoeffizienten für die Präzision von Serie zu Serie bei der Blutzelldifferenzierung rangieren zwischen 4,45 % für die neutrophilen Granulozyten und bei 31,0 % für die eosinophilen Granulozyten und Monozyten. Die Zählung der Lymphozyten variiert um 11,3 %. MORITZ (2000) berichtet für die Tierarten Hund, Katze, Pferd, Rind und Schaf beim Technicon H*1 über Variationskoeffizienten von

2,4 % - 4,8 % bei der neutrophilen Granulozytenzählung und für die Lymphozytenzählung 3,5 % - 10,9 %. Diese Werte entsprechen denen des ADVIA 120. Außergewöhnlich ist die starke Abweichung der eosinophilen Granulozyten: MORITZ führt hier Werte zwischen CV: 6,9 % - 15,6 % an und unterschreitet damit die für den ADVIA 120 ermittelten Werte. Die Variationskoeffizienten der Monozytendifferenzierung erstrecken sich bei MORITZ von 13,8 % bis 0,4 % und gehen mit den oben genannten Resultaten konform.
Die Überprüfung der Präzision der Ergebnisse innerhalb einer Serie bestätigt die oben beschriebenen Resultate. Die hier erhaltenen Werte zeichnen sich in der Regel durch geringfügig höhere Variationskoeffizienten aus.

4.1.3 Antikoagulanzienvergleich

Die Abweichungen zwischen den einzelnen Antikoagulanzien stellt sich wie folgt dar. Der Unterschied zwischen Li-Heparin und Na-Citrat ist beim Gruppenvergleich am geringsten. K_3-EDTA, verglichen mit Li-Heparin, erzeugt ebenfalls geringe Abweichungen. Auffällig ist ein Unterschied von 5,2 % bei der Leukozytenzählung. Die größten Unterschiede kann beim Vergleich von K_3-EDTA mit Na-Citrat festgestellt werden. Unabhängig vom paarweisen Vergleich wurden bei der Thrombozytenzählung die größten relativen Unterschiede festgestellt, dicht gefolgt von der eosinophilen und basophilen Granulozytenzahl. Von BEDDIES (1999) und SEEGERS (1997) ist der Einfluß von Li-Heparinblut auf die Thrombozytenzählung beim Schaf und beim Pferd beschrieben worden. Beide Autoren führen dies auf die erhöhte Agglutinationsneigung der Thrombozyten bei der Verwendung von Li-Heparin als Antikoagulanz zurück. Dieses geht konform mit den Beobachtungen beim Rind, da durch die erhöhte Anzahl von Thrombozytenaggregaten der MPC rapide abfällt und die Fehlermeldung *PLT Clumps* den Untersucher auf eine erhöhte Zahl (> 350) Thrombozytenaggregate hinweist.
Aufgrund des negativen Einflusses von Li-Heparin auf die Zählung der Thrombozyten durch Aggregatbildung und damit auf die Thrombozytendichte (MPC) ist der Einsatz als Gerinnungshemmer bei Blutproben, die am ADVIA 120 gemessen werden, abzulehnen. Der Nachteil von Na-Citrat liegt in der Verdünnung der Probe,

demzufolge zu niedrigen Zellzahlen, welche eine rechnerische Korrektur der Ergebnisse erforderlich machen.

4.1.4 Blutalterung

Der Einsatz des ADVIA 120 wird auf große Kliniken und kommerzielle Laboratorien beschränkt bleiben. Der erforderliche Transport verlängert den Zeitraum zwischen Probeentnahme und Analyse. Der Einfluß der Lagerungsdauer und der Lagerungstemperatur (4 °C und 22 °C) ist anhand von je zehn Blutproben über 72 Stunden überprüft worden.
Das rote Blutbild (RBC, HGB, MCH, MCV, HCT) unterliegt bei 4 °C und bei 22 °C Lagertemperatur über den gesamten Zeitraum einer Veränderung, die aber 5 % nicht übersteigt. Die Leukozytenzahl fällt bei 22 °C Lagertemperatur nach 24 Stunden ab; dies kann durch eine Lagerung bei 4 °C vermieden werden. Insgesamt weichen die gemessenen Leukozytenzahlen bei 4 °C Lagertemperatur nach 72 Stunden maximal um 10 % ab.
Großen Einfluß hat die Lagerungsdauer auf die Parameter der Thrombozytenzählung. Unabhängig von der Lagerungstemperatur ist nach einer Lagerungsdauer von mehr als zwölf Stunden eine klinische Interpretation der Daten aufgrund der großen Streuung der Ergebnisse nicht zu empfehlen.
Ähnlich ist der Sachverhalt bei der Differenzierung der Leukozyten: die Zellen unterliegen bei der Lagerung optischen und zytochemischen Veränderungen und werden infolgedessen vom Analysesystem falschen Zellpopulationen zugeordnet (siehe auch Kapitel 3.2.4.2). Auf diese Problematik wird der Untersucher durch den ADVIA 120 mittels Fehlermeldungen bei den einzelnen Parametern aufmerksam gemacht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß ein kleines Blutbild auch nach 24 Stunden erstellt werden kann. Aber für die korrekte Thrombozytenbestimmung ist eine Untersuchung innerhalb von 4-6 Stunden nach Blutentnahme erforderlich. Das Differentialblutbild sollte bei einer Transportzeit von mehr als 24 Stunden durch eine manuelle Differenzierung, von einem bei Blutentnahme angefertigten Objektträgers, erfolgen.

Das ICSH (1994) empfiehlt eine Untersuchung innerhalb von vier Stunden nach Blutentnahme für die Analyse von humanen Blutproben. Die Untersuchung von bovinen Blutproben sollte im Hinblick auf eine sichere Diagnostik aller Parameter ebenfalls in diesem Zeitraum erfolgen oder auf ein kleines Blutbild beschränkt bleiben. Untersuchungen von BLEUL (1998) und GROMMELT (1999) mit Rinderblut stimmen mit diesen Ergebnissen überein.

4.1.5 Verschleppung (carry over) und Linearität

Zur Überprüfung der Linearität wurden speziell aufbereitete Proben mit hohen analytischen Werten für die Parameter WBC, RBC, HB und PLT am ADVIA 120 gemessen. Die Linearität der Ergebnisse ist für die Leukozyten von 0 bis 120 G/l gegeben, bei der Thrombozytenzählung sind die Ergebnisse bis zu einer Zellkonzentration von 2500 G/l konstant. Die Zählung der Erythrozyten liefert stabile Resultate bis 12 T/l.
Das Verbleiben von Zellen im Leitungssystem eines Zellzählgerätes nach einer Messung führt bei Reihenuntersuchungen zu einer Verfälschung von zytopenischen Blutproben. Dieser Carry over ist für den ADVIA 120 mittels Messung von Proben mit hohen Zellkonzentrationen und zellfreiem Plasma bestimmt worden. Dabei wurden die vom Hersteller angegebenen Grenzen für humanes Blut für den RBC (0,2 %) mit 0,09 % deutlich unterschritten. Das gleiche gilt für den WBC (0,4 % zu 0,18 %) und den Hämoglobingehalt (0,02 % zu 0 %). Der für den Menschen angegebene Carry over für die Thrombozytenzählung von 0,1 % wird bei Rinderthrombozyten mit einer Verschleppung von 0,26 % nicht eingehalten. BLEUL(1998) beschreibt für den Cell-Dyn 3500 die Thrombozyten einen Carry over von 1,5% und liegt damit deutlich über den Werten des ADVIA 120.

4.2 Erstellung von rasse- und altersabhängigen Referenzbereichen

Mit der Erstellung der Referenzbereiche in dieser Untersuchung sollte einerseits dem Einfluß von veränderten Haltungsbedingungen in der modernen Milchviehwirtschaft Rechnung getragen werden, andererseits stellt die Entwicklung von Hämatologiesystemen mit neuen Parametern den Kliniker vor die spannende Frage, inwiefern diese Parameter ein diagnostisches Hilfsmittel darstellen. Diese Fragestellungen werden in den anschließenden Kapiteln diskutiert. Dabei sollen die bekannten Parameter mit Referenzbereichen aus der Literatur verglichen werden und die neuen Parameter mit den Erkenntnissen von anderen Spezies verglichen und besprochen werden.

4.2.1 Parameter des roten Blutbildes

Das Zusammenspiel der verschiedenen Parameter von der Geburt bis zu einem Alter von 10 Jahren zeigt, daß der Hämoglobingehalt im Blut über die gesamte Lebensspanne nahezu konstant ist. Die Erythrozytenzahl entwickelt sich gegenläufig zum Erythrozytenvolumen. Die Abnahme der Erythrozytenzahl wird durch eine Zunahme des Erythrozytenvolumens kompensiert; der Hämatokritwert ist dadurch in diesem Zeitraum nur geringen Änderungen unterworfen. Der CHCM steigt vom Zeitpunkt der Geburt zuerst rasant an, um danach in einen moderaten Anstieg über zu gehen. Die Retikulozytenzahl im zirkulierenden Blut fällt nach der Geburt parallel mit der Erythrozytenzahl ab.
Im nun folgenden Abschnitt erfolgt eine Besprechung der einzelnen Parameter.

Die **Erythrozytenzahl** entwickelt sich in den ersten sechs Monaten ohne Alterseinfluß. Der Referenzbereich liegt zwischen **7,79 und 11,59 T/l.** POMSEL (1980) beschreibt in seiner Arbeit eine Zunahme des RBC bis zum Alter von sechs Monaten; zu diesem Zeitpunkt gibt er einen Referenzbereich von 7,17 - 10,15 T/l an. STÖBER u. GRÜNDER (1990) dagegen legen für Kälber die untere Grenze bei 5,0 T/l und die obere Grenze bei 10,0 T/l fest. Ein Erklärung für die Zunahme der Erythrozytenzahl um über 1,0 T/l in der Gruppe bis 6 Monaten

gegenüber der Arbeit von STÖBER u. GRÜNDER sowie POMSEL (1980) kann in der gesetzlichen Festlegung der Eisenversorgung von Kälbern vermutet werden.

Für die Altersgruppe von 6 - 24 Monaten verringerte sich die Erythrozytenzahl monatlich um 0,13 T/l, so daß bei einem Alter von 16 Monaten der Referenzbereich **6,72 –10,32 T/l** beträgt**,** wobei der Referenzbereich der Fleckviehtiere um 0,50 T/l niedriger als die der schwarzbunten Rinder liegt. Bei den Tieren über 24 Monaten Lebensalter ist weder ein Rasseeinfluß noch ein relevanter Alterseinfluß feststellbar. Der Referenzbereich ist mit einer Spannweite von **5,90 – 8,44 T/l** mit den Ergebnissen von STÖBER u. GRÜNDER (1990) für erwachsene Rinder weitgehend identisch.
Der **Hämoglobingehalt** zeigt keine Abhängigkeit vom Alter. In der Altersgruppe über zwei Jahre ist der Mittelwert der schwarzbunten Rinder um 0,3 mmol/l höher als der Mittelwert der Fleckviehkühe. Ein Vergleich mit den Werten von POMSEL (1980) zeigt ebenfalls, daß der Hämoglobingehalt keine eindeutige Entwicklung in Abhängigkeit vom Alter zeigt. Für die Gruppe jünger als sechs Monate kann demnach ein Referenzbereich von **6,03 – 8,42 mmol/l** angegeben werden, für die Tiergruppe der heranwachsenden Rinder 6-24 Monate lautet dieser Bereich **6,00 – 8,62 mmol/l**. Eine Unterteilung der Altersgruppen erscheint hier nicht weiter sinnvoll, so daß der Referenzbereich für Tiere bis zum Alter von 24 Monaten **6,00 – 8,62 mmol/l** beträgt. Laut Kälberhaltungsverordnung muß bei Kälbern ein auf die Gruppe bezogener durchschnittlicher Hämoglobinwert von mindestens 6 mmol/l Blut gewährleistet sein (BGBl., 1997). STÖBER u. GRÜNDER (1990) geben für Kälber einen Referenzbereich von 4,9 – 8,7 mmol/l an. Unter dem Gesichtspunkt des Tierschutzes muß dieser geänderte Referenzbereich dringend in die tägliche Praxis übernommen werden. Aus dem selben Grund erscheint auch eine Angabe von altersabhängigen Referenzbereichen als unabdingbar.
Für die Tiere über 24 Monaten ergab sich ein Referenzbereich von **5,50 – 8,14 mmol/l.** Dieses stimmt mit dem von KRAFT (1997) (5,6 - 8,7 mmol/l) angegebenen Referenzbereich für das Rind weitgehend überein. Daraus läßt sich für die von KRAFT (1997) verwendeten Referenzbereiche folgern, daß die Referenzpopulation fast ausschließlich aus adulten Tieren bestanden hat.
Der **Hämatokritwert** entwickelt sich in den ersten 24 Monaten einheitlich, so daß keine Unterteilung erfolgt. Der Hämatokritwert verringert sich von der Geburt bis zum Alter von 24 Monaten stetig. Danach bleibt der Referenzbereich stabil. Im Alter von

2 Monaten liegt der Referenzbereich bei **0,26 – 0,38 l/l.** Ab 24 Monaten bleibt der Referenzbereich von **0,24 – 0,35 l/l** stabil. Der Rasseunterschied von 0,01 l/l erscheint hier nicht von Bedeutung. Sowohl STÖBER u. GRÜNDER (1990) wie auch KRAFT (1997) und MORITZ (2000) sowie JAIN (1993) machen keine altersbedingten Unterscheidungen.

Das **mittlere Erythrozytenvolumen** ist in Abhängigkeit vom Alter starken Veränderungen unterlegen. Der Referenzbereich für die Jungendklasse erreicht mit sechs Monaten den niedrigsten Wert: **27,00 – 36,10 fl**. Mit 16 Monaten besitzen die Erythrozyten wieder das gleiche Volumen wie zum Geburtszeitpunkt von **31,40 – 42,95 fl.** Die Tiere über 24 Monate Lebensalter zeigen einen langsamen Anstieg des Erythrozytenvolumens von 0,052 fl pro Jahr. Bei einem Lebensalter von vier Jahren liegt das Erythrozytenvolumen zwischen **37,70 und 50,00 fl**. Ein Rasseeinfluß ist nur in der Altersgruppe der 6 – 24 Monate alten Tiere zu bemerken. Dabei liegt das Erythrozytenvolumen der Fleckviehrinder um 2,2 fl über dem der SB. POMSEL (1980) ermittelt bei den vier Monate alten Tieren die kleinsten Erythrozytenvolumina und gibt für dieses Alter einen Mittelwert von 34 fl an; damit liegt er über dem niedrigsten Wert dieser Untersuchung von 32 fl mit sechs Monaten. Ähnliche Angaben sind auch bei MORITZ (2000) zu finden. Alle übrigen oben zitierten Autoren geben als Referenzbereich für alle Altersgruppen zusammen einen um 10 bis 15 fl höheren Bereich an. Eine Ursache dafür kann in der direkten Messung dieses Parameters liegen, wohingegen in älteren Arbeiten der MCV aus Hämatokritwert und Erythrozytenzahl berechnet wurde.

Die **Mittlere Hämoglobinkonzentration** der Erythrozyten (MCHC) und der CHCM zeigen keinen alteräbhängigen Unterschied. Ein Rasseunterschied besteht hier in der Altersgruppe der Tiere älter 6 Monate, wobei das DFV einen um 0,2 - 0,5 mmol/l niedrigeren Referenzbereich besitzt als das SB Rind. Die Referenzbereiche zu ausgewählten Zeitpunkten setzen sich wie folgt zusammen: im ersten Lebensmonat ist der **CHCM (20,36 – 22,35 mmol/l)** sowie der **MCHC (20,20 – 22,36 mmol/l)** am niedrigsten, danach steigt der **CHCM** auf **21,89 – 24,75 mmol/l** und der **MCHC auf 21,47 – 24,18 mmol/l** im Alter von sechs Monaten. Bis 24 Monate Lebensalter steigen beide Parameter langsam an, sodaß mit 16 Monaten der **CHCM auf 22,12 – 24,98 mmol/l** und der **MCHC auf 22,01 – 24,72 mmol/l** ansteigt. Ab dem 24sten Lebensmonat ist ein Alterseinfluß nicht mehr feststellbar, so daß für diese Gruppe der Referenzbereich für den **CHCM 22,31 – 24,15** mmol/l und den **MCHC 22,29 – 24,34** mmol/l beträgt. Die aus der zitierten Literatur bekannten Referenzbereiche für

den MCHC liegen jeweils um 2-3 mmol/l unter den mit dem ADVIA 120 ermittelten Werten. Eine Ausnahme bildet hier der Referenzbereich von MORITZ (2000), bei dem die obere Grenze mit 27,31 mmol/l deutlich höher liegt. Bei POMSEL (1980) ist ein eindeutiger Alterseinfluss nicht zu erkennen. BEDDIES (1999) findet beim Schaf einen zum Rind vergleichbaren Anstieg des MCHC in den ersten Lebensmonaten.

Der **mittlerer Zellulärer Hämoglobingehalt** ist in den ersten sechs Monaten stabil, der Referenzbereich beträgt in dieser Zeit **0,66 - 0,84** fmol. Bis zum Alter von 24 Monaten erfolgt ein Anstieg des MCH um 0,014 fmol pro Monat, mit 16 Monaten liegt der Referenzbereich zwischen **0,73 – 1,00 fmol**. Ab dem zweiten Lebensjahr bleibt der MCH stabil, sodaß für den gesamten Zeitraum der Referenzbereich mit **0,86 - 1,16 fmol** angegeben werden kann. MORITZ (2000) kommt für den MCH bei seiner Studie zu identischen Ergebnissen (0,65 – 1,17 fmol). JAIN (1993) kommt ebenfalls zu vergleichbaren Ergebnissen. STÖBER u. GRÜNDER (1990) sowie KRAFT (1997) weichen von diesen Ergebnissen um durchschnittlich 0,20 fmol ab. DUFFIELD (2000) beschreibt für Milchkühe in einer ähnlichen Untersuchung am ADVIA 120 identische Referenzbereiche.
Die **Erythrozytenverteilungsbreite** steigt in den ersten sechs Monaten um 0,29 % pro Monat auf **18,34 – 23,13 %** mit 5 Monaten. Zwischen 6 und 24 Monaten verändert sich die RDW nicht, sodaß für den gesamten Zeitraum ein Referenzbereich von **17,33 – 23,48** % angegeben werden kann. Bei Rindern über 24 Monate verringert sich die RDW unmerklich. Für diese Gruppe lautet der Referenzbereich **16,81 – 21,91** %. Auch hier zeigt sich eine hervorragende Übereinstimmung mit den Ergebnissen von DUFFIELD (2000).
Die **Hämoglobinverteilungsbreite** zeigt keine starken Schwankungen über alle Altersgruppen. Der Referenzbereich für diesen Parameter wurde mit 1,30 – 1,68 mmol/l ermittelt. MORITZ (2000) gibt hier einen Bereich von 1,06 – 1,88 mmol/l für das Rind an.
Beim Referenzbereich für die absolute Anzahl der **Retikulozyten** werden zwei Altersgruppen unterschieden. Bei der Gruppe bis zwei Jahre besteht eine starke Altersabhängigkeit. Der untere Grenzwert unterliegt geringen Schwankungen und nimmt von der Geburt bis zum Alter von 24 Monaten von **5,76 G/l** auf **3,04 G/l** ab. Der obere Grenzwert zeigt in diesem Zeitraum einen Rückgang von **36,0 G/L** auf **19,0 G/l.** Bei Rindern über 24 Monaten konnte in dieser Untersuchung ein Referenzbereich von **2,84 – 17,26 G/l** etabliert werden. Diese Ergebnisse der

Retikulozytenzählung müssen immer im Zusammenhang mit der geringen Wiederholbarkeit der Meßergebnisse bei Proben mit geringen Retikulozytenzahlen, gesehen werden. Unter gleichem Vorbehalt gibt MORITZ (2000) einen Referenzbereich von 1,89 – 95,95 G/l an. STÖBER u. GRÜNDER (1990) geben für Kälber einen oberen Grenzwert von 100 G/l an. Nach Angaben der übrigen Autoren finden sich bei gesunden Kälbern keine Retikulozyten im Blut.

4.2.2 Parameter der Thrombozytenzählung

Die **Thrombozytengesamtzahl** ist in den ersten Lebensmonaten sehr variabel. Dementsprechend umfaßt der Referenzbereich eine große Spanne. Im Alter von zwei Monaten liegt der untere Grenzwert bei **237 G/l** und der obere Grenzwert bei **1025 G/l**. Mit zunehmendem Alter verkleinert sich die Spannweite. Mit 16 Monaten liegt der Referenzbereich zwischen **197 – 648 G/l**. Gleiche Veränderungen werden von BEDDIES (1999) für das Schaf beschrieben. Alter von 24 Monaten beträgt der Referenzbereich **186 – 596 G/l**, zu diesem Zeitpunkt besitzt das Alter keinen Einfluß mehr auf die Thrombozytenzahl. Der Rasseeinfluß zeigt sich nur in der mittleren Altersgruppe in der Art, daß beim Fleckvieh um 50 G/l höhere Werte angegeben werden müssen. MORITZ (2000) gibt unabhängig vom Alter eine Spanne von **155 – 1022 G/l** an; DUFFIELD (2000) gibt für laktierende Milchkühe einen Referenzbereich von 160 – 650 G/l an. Die Angaben von STÖBER u. GRÜNDER (1990) und KRAFT (1997) unterscheiden sich von diesen Ergebnissen deutlich. Eine Ursache kann, wie von MORITZ (2000) ebenfalls vermutet, in der gegenüber älteren Methoden empfindlicheren 2D-Thrombozytenanalytik des ADVIA 120 liegen.
Das **Mittlere Thrombozytenvolumen** zeigt in keiner Gruppe eine klinisch relevante Abhängigkeit vom Alter. Gleichwohl kann eine Zunahme des Volumens in der Gruppe der adulten Kühe im Vergleich zu den Jugendklassen beobachtet werden. Der von MORITZ (2000) angegebene altersunabhängige Referenzbereich von 5,07 – 9,73 fl konnte in dieser Untersuchung nur bedingt reproduziert werden. Der Referenzbereich für die Altersgruppe bis sechs Monate beträgt **3,30 – 4,48** fl, für die mittlere Altersgruppe bis 24 Monate **3,44 – 4,57** fl und für die Gruppe über 24 Monaten ergab sich der Referenzbereich von **3,61 – 5,00** fl. In der Gruppe der adulten Tiere besitzen die Fleckviehkühe um 0,25 fl kleinere Thrombozyten als die schwarzbunten Tiere. BEDDIES (1999) findet bei Schafen einen ähnlichen Verlauf des MPV. CHAPMAN (2001) beschreibt in einem Fallbericht über große

Thrombozyten bei einem Traumapatienten.
Die **Mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile bzw. Thrombozytendichte** ist von MACEY et al. (1998) als Indikator für die Thrombozytenaktivierung beschrieben worden. Beim Rind steigt der MPC bis zum Alter von sechs Monaten rasant an, um dann bis zum Alter von 2 Jahren nur noch mäßig anzusteigen, und bei den Tieren über zwei Jahren kommt es zu einem klinisch nicht relevanten Rückgang des MPC von 0,0001 g/l pro Lebensjahr. Der Rasseunterschied zeigt sich dergestalt, daß schwarzbunte Tiere um 7 – 10 g/l höhere Werte aufweisen. Für die Gruppe von Tieren jünger als 6 Monate kann ein mittlerer Referenzbereich bei einem Alter von zwei Monaten mit **220 – 264 g/l**, in der Gruppe bis 2 Jahre lautet der ermittelte Referenzbereich für 16 Monate alte Tiere **241 – 282 g/l**. Für adulte Tiere beträgt der Referenzbereich **243 – 283 g/l**. MORITZ (2000) gibt den Referenzbereich mit 159,70 – 246,80 g/l an.
Die **mittlere Thrombozytenmasse** zeigt die gleiche altersabhängige und rasseabhängige Entwicklung wie der MPM. AHNADI et al. (2001) untersuchen die Aussagekraft des MPC an Patienten mit Brustschmerz. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß der MPC ein geeigneter Parameter zur Früherkennung des akuten Koronarsyndroms ist. Für zwei Monate alte Tiere lautet der Referenzbereich **0,80 – 0,99 pg** und für über zwei Jahre alte Tiere **0,90 – 1,20 pg**. MORITZ (2000) gibt den MPC mit 1,0 – 1,6 pg an.

Die Bedeutung der neuen Thrombozytenparameter zur Früherkennung und Diagnose von Krankheiten für das Rind muß nun mit Hilfe dieser Referenzbereiche in weiteren Studien untersucht werden. Erste Ergebnisse aus der Humanmedizin deuten an, daß es sich um sehr sensitive Parameter handelt.

4.2.3 Parameter des weißen Blutbildes

Das weiße Blutbild des Rindes entwickelt sich von einem neutrophilen Blutbild zu einem lymphozytärem. Die Ursache liegt in einer Zunahme der Lymphozyten im zirkulierendem Blut, dagegen bleibt die Zahl der neutrophilen Granulozyten nahezu über die gesamte Lebensspanne unverändert.
Die **Gesamtleukozytenzahl** weist bis zum Alter von 24 Monaten keine Unterschiede

zwischen den Rassen SB und DFV auf, in der folgenden Altersgruppe zeigt sich ein Unterschied von 1,10 G/l. Mit sechs Monaten ist die Leukozytenzahl mit einem Referenzbereich von **6,77 – 14,88 G/l** am höchsten. Danach erfolgt ein kontinuierlicher Rückgang des WBC auf, so daß mit einem Alter von 10 Jahren der Referenzbereich **4,36 – 9,79 G/l** lautet. JAIN (1986) beschreibt gleichfalls einen Rückgang der Leukozyten mit zunehmendem Alter und gibt für die Altersgruppe der ein- bis zweijährigen weiblichen Holsteinrinder einen Referenzbereich von 4,32 – 7,8 G/l an. Eine ähnlich gute Übereinstimmung findet sich bei MORITZ (2000); in einer altersunabhängigen Untersuchung gibt er eine Spannweite für die Leukozytenzahl von 5,60 – 14,31 G/l an. STÖBER u. GRÜNDER (1990) beschreiben ebenfalls eine Abnahme der weißen Blutzellen im Blut älterer Rinder. Sie geben aber als oberen Grenzwert um bis zu 5,00 G/l niedrigere Werte an. Ähnliche Angaben wie bei STÖBER u. GRÜNDER finden sich auch bei KRAFT (1997) und bei SCHALM (1977).

Die statistische Auswertung der Anzahl der **neutrophilen Granulozyten** erfolgte in zwei Gruppen. Dabei konnte sowohl in der Gruppe mit den Tieren jünger als 24 Monate, als auch bei den Rindern älter als 24 Monate, kein signifikanter Einfuß auf die Referenzbereiche festgestellt werden. Der Referenzbereich für die Tiere bis 24 Monaten liegt bei **1,09 – 4,82 G/l,** und für die erwachsenen Rinder lautet der Referenzbereich **1,77 – 5,53 G/l**. MORITZ (2000) und DUFFIELD (2000) geben für adulte Rinder bezüglich des oberen Grenzwertes geringfügig höhere Werte an. Eine ähnlich gute Übereinstimmung liegt auch für die **Lymphozytenzählung** vor. MORITZ (2000) gibt hier 2,72 – 8,75 G/l an. Für vier Wochen alte Kälber liegt der Referenzbereich zwischen **3,18 und 7,69 G/l**. Mit zunehmendem Alter erfolgt ein langsamer Anstieg der Werte, so daß im Alter von sechs Monaten **4,50 – 10,75 G/l** Lymphozyten im Blut zirkulieren. Bei Rindern älter 24 Monate fällt die Leukozytenzahl wieder ab. Der Referenzbereich bei einem Alter von 8 Jahren beträgt **3,53 – 9,25 G/l**. POMSEL (1980) findet bei Rindern mit vier Monaten die höchste Lymphozytenzahl. KRAFT (1997) sowie STÖBER u. GRÜNDER (1990) geben den oberen Grenzwert für adulte Rinder mit 5,50 G/l an. Der von STÖBER u. GRÜNDER (1990) ermittelte Referenzbereich für Kälber deckt sich mit den eigenen Untersuchungen.

Für die Gruppe der **Monozyten** ist der Referenzbereich bei der Gruppe der Kälber bis sechs Monate **0,32 – 1,49 G/l**. Bis zum Alter von 24 Monaten sinkt die Monozytenzahl, der Referenzbereich beträgt bei 16 Monate alten Rindern **0,28 –**

0,95 G/l. Rinder über zwei Jahre haben einen stabilen Referenzbereich von **0,24 - 0,90 G/l**. In dieser Altersgruppe ist ein Rasseunterschied von 0,10 G/l vorhanden. POMSEL (1980) findet keinen eindeutigen Alterseinfluß bei der Auswertung der Literaturdaten. MORITZ (2000) gibt altersunabhängig einen Referenzbereich von 0,18 – 0,88 G/l an. Bei JAIN (1993) liegt der Referenzbereich zwischen 0,03 – 0,84 G/l und KRAFT (1997) gibt 0,00 – 0,33 G/l an. Die Unterschiede die sich hier zeigen, sind hinsichtlich der geringen Anzahl von zirkulierenden Monozyten im Blut auf statistische Schwankungen zurückzuführen.

Die Zahl der **eosinophilen Granulozyten** steigt bis zum Alter von 24 Monaten auf 0,10 – 1,69 G/l und sinkt danach wieder auf 0,13 – 1,24G/l ab. In der Literatur werden weitgehend identische Referenzbereiche angeben. JAIN (1993) gibt den höchsten oberen Grenzwert mit 2,40 G/l an. Für die Gruppe der **basophilen Granulozyten** sind keine Unterschiede zu den zitierten Autoren gefunden worden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Bestimmung hämatologischen Parameter ist Bestandteil der weiterführenden Diagnostik bei buiatrischen Patienten. Die Blutprobenanalysen erfolgt dabei immer mehr mittels automatischer Hämatologiesysteme. Das zunächst für den humanmedizinischen Einsatz konzipierte lasergestütze Multiparametersystem ADVIA 120 ist im Rahmen dieser Arbeit in enger Kooperation mit der Herstellerfirma Bayer Diagnostics an die Anforderungen boviner Blutproben angepaßt worden. Neben dieser Softwareadaptation in vier Schritten erfolgte begleitend die Geräteevaluation. Abschließend wurden mit dem ADVIA 120 für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und deutsch Fleckvieh altersabhängige Referenzbereiche für bekannte und neue Parameter erstellt.

Die Softwareadaptation und begleitende Evaluation erfolgte anhand von 245 Blutproben von gesunden und kranken Rindern im Alter von einem Tag bis zu zwölf Jahren. Die Korrelation der Ergebnisse des ADVIA 120 mit den Messungen des Sysmex F-800 und Technicon H*1 ist für die Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, MCV und MCH exzellent ($r > 0{,}96$). Die Blutzelldifferenzierung korreliert mit den Ergebnissen der manuellen Auszählung unabhängig von der Färbemethode für die neutrophilen Granulozyten ($r > 0{,}95$), Lymphozyten ($r > 0{,}90$) und eosinophilen Granulozyten ($r = 0{,}80$) gut bis sehr gut. Die Übereinstimmung bei der Monozytendifferenzierung ist im Vergleich zur α-Naphtylesterasefärbung ($r = 0{,}51$) befriedigend, bezüglich der basophilen Granulozyten besteht zur manuellen Differenzierung keine Übereinstimmung.

Die Präzision sowohl innerhalb einer Serie als auch über verschiedene Serien hinweg für die Parameter WBC, RBC, HGB, MCV, HCT, MCH, MCHC, HDW und RDW ist hervorragend (CV < 3%), die Wiederholbarkeit bei den Parametern PLT, MPV, PDW und MPC befriedigend (CV = 1,50 – 6,78%). Die Wiederholbarkeit der Retikulozytenzählung erreicht nur unbefriedigende Werte (CV = 37,87 – 61,20%). Die Präzision der Blutzelldifferenzierung ist für die neutrophilen Granulozyten als gut zu bezeichnen (CV < 4,98 %). Hinsichtlich der Lymphozyten und Monozyten ist die Wiederholbarkeit schlechter (CV =11,13 % - 31,03 %). Die Zählung der eosinophilen Granulozyten zeigt über verschiedene Serien hinweg einen Variationskoeffezienten von 31,15 %; dieses Ergebnis wird durch den physiologischerweise geringen Anteil eosinophiler Granulozyten am Blutbild und der damit verbundenen statistischen Anfälligkeit der Zählung für Koinzidenzen verursacht. Linearität und Verschleppung

des ADVIA 120 sind für die Parameter RBC, WBC und HGB als sehr gut und für den Parameter PLT als gut zu bezeichnen.
Die Bestimmung der Blutalterung anhand von 10 Proben zeigt, daß die Lagerdauer einen größeren Einfluß auf die Haltbarkeit von Rinderblutproben hat als die Lagerungstemperatur. Die Ergebnisse der Blutzellzählung bleibt für WBC, RBC, HGB, MCV, MCH bei 4 °C bis zu 72 Stunden stabil. Die Thrombozytenzählung liefert bis 12 Stunden nach Blutentnahme bei 22 °C Lagerungstemperatur akzeptable Ergebnisse. Die Blutzelldifferenzierung erfährt durch die Lagerung bei Raumtemperatur bis 12 Stunden nach der Blutentnahme keine Veränderungen. Eine Verfälschung der Blutzelldifferenzierung durch einen längeren Transport kann mittels der zusätzlichen Einsendung eines Blutausstriches vermieden werden. Der Vergleich der Antikoagulanzien Li-Heparin, Na-Citrat und K_3-EDTA zeigt eindeutig den Vorteil von K_3-EDTA beim Einsatz am ADVIA 120.

Im zweiten Schritt dieser Arbeit wurden mit dem ADVIA 120 altersabhängige Referenzbereiche für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und Deutsch Fleckvieh erstellt. Von 432 gesunden Rindern wurden K_3-EDTA Blutproben innerhalb von 5 Stunden nach Entnahme analysiert. Die Daten wurden mittels einer nichtparametrischen Regression mit einem lokal gewichteten Regressionsglätter (S-Plus Version 3.1, Statistical Sciences, Inc.) analysiert und in drei Altersgruppen eingeteilt (< 6 Monate, 6 – 24 Monate, > 24 Monate). Für jede Altersgruppe wurde der Einfluß der Rasse durch eine einfaktorielle Kovarianzanalyse mit dem Programm BMDP1V (Dixon, 1993) ermittelt.
Mit Hilfe der abgebildeten Formel ist es nun möglich, für altersabhängige Parameter individuell angepaßte parametrische Referenzbereiche zu berechnen.

$$y(x) = a + b \cdot x \pm t_{1-\alpha/2,\, n-3} \cdot \sqrt{\frac{n+1}{n}} \cdot s$$

a = *Y- Achsenabschnitt der Regressionsgeraden*
b = *Steigung der Regressionsgeraden*
x = *Altersangabe in Monaten*
t = *Wert der Student Verteilung für die zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit* α *bei n-3 Beobachtungen*
α = *vorausgewählte zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit*
n = *Anzahl der Beobachtungen*
s = *Standardabweichung*

Die abschließenden Tabellen 40 – 42 stellen die Referenzbereiche der Altersgruppen < 6 Monate, 6 – 24 Monate und > 2 Jahre für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und das deutsche Fleckvieh dar. Aus den Tabellen kann für Parameter, die einem Alterseinfluß unterliegen, mit Hilfe der angegebenen Formel der gewünschte Referenzbereich für jedes beliebige Alter errechnet werden. Dazu muß in der Formel der entsprechenden Altersgruppe die Variable x durch das Alter in Monaten bzw. bei Tieren, die älter als 24 Monate sind, durch das Alter in Jahren ersetzt werden. Besteht bei einem Parameter kein Rasseunterschied, gilt die angegebene Formel für beide Rassen. Zusätzlich zur Formel wird in der mittleren Spalte für altersabhängige Parameter zu ausgewähltem Alter ein Referenzbereich zur Veranschaulichung angegeben. Bei Parametern, für die kein Alterseinfluß vorliegt, erfolgt ausschließlich die Vorstellung des Referenzbereiches.

Tab. 40: Zusammenfassung der Referenzbereiche für Rinder < 6 Monate. Die Angabe des Referenzbereiches erfolgt für beide Rassen gemeinsam.

Parameter	Referenzbereich beim Alter von 4 Monaten	Formel der Regressionsgeraden-gleichung zur Berechnung altersabhängiger Referenzbereiche
RBC T/l	8,00 - 11,80	*
HGB mmol/l	6,00 - 8,40	*
HCT l/l	-	-
MCV fl	28,50 - 37,50	y = 35,75 – 0,70 x ± 4,55
CHCM mmol/l	23,40 - 25,40	y = 21,0 + 0,36 x ± 1,00
MCHC mmol/l	21,10 - 23,30	y = 20,99 + 0,29 x ± 1,08
MCH mmol/l	0,70 - 0,80	*
RDW %	17,95 - 22,78	y = 19,19 +0,29 x ± 2,4
HDW mmol/l	1,40 - 1,70	y = 1,71 – 0,043 x ± 0,16
Retikulozyten G/l *	10,2 - 15,2	y = lg (1,16 - 0,014 x ± lg 0,398)
PLT G/l	154,90 - 943,10	y = 713 – 41 x ± 394,12
MPV f/l	3,40 - 4,50	*

– siehe bei Altersgruppe: < 24 Monate, * kein Alterseinfluß

Fortsetzung Tab. 40:

Parameter	Referenzbereich beim Alter von 4 Monaten	Formel der Regressionsgeradengleichung zur Berechnung altersabhängiger Referenzbereiche
MPC g/dl	22,70 - 27,10	y = 23,47 + 0,36 x ± 2,20
MPM pg	0,74 - 0,92	y = 0,87 – 0,01 x ± 0,09
PDW %	36,90 - 85,10	*
PCDW g/dl	4,44 - 5,32	*
WBC G/l	6,10 - 14,20	y = lg (0,89 + 0,02 x ± 0,18)
Neutrophile Granulozyten G/l	1,10 - 4,80	*
Lymphozyten G/l	4,10 - 9,90	y = lg (0,66 + 0,037 x ± 0,19)
Monozyten G/l	0,30 - 1,30	y = lg (-0,22 ± 0,33)
Eosinophile Granulozyten G/l	-	-
Basophile Granulozyten G/l	1,23 - 4,46	y = lg (-0,32 – 0,012 x ± 0,28)
Neutrophile Granulozyten %	4,90 - 36,50	y = 32,33 – 2,91 x ±15,78
Lymphozyten %	50,80 - 79,00	y = 55,89 + 2,25 x ± 14,07
Monozyten % #	-	-
Eosinophile Granulozyten % #	-	-
Basophile Granulozyten %	1,25 - 2,85	y = lg (0,34 – 0,009 x ± 0,18)

– siehe bei Altersgruppe: < 24 Monate, * kein Alterseinfluß

Tab. 41: Zusammenfassung der Referenzbereiche für Rinder 6 - 24 Monate

	Referenzbereich beim Alter von 16 Monaten		**Formel der Regressionsgeradengleichung zur Berechnung altersabhängiger Referenzbereiche**	
Parameter	**Schwarzbunte Holstein**	**Deutsches Fleckvieh**	**Schwarzbunte Holstein**	**Deutsches Fleckvieh**
RBC T/l	6,70 - 10,30	6,20 - 9,80	y = 10,6 – 0,13 x ± 1,8	y = 10,1 – 0,13 x ± 1,8
HGB mmol/l	6,00 - 8,60		***	
**HCT l/l[#] ** **	0,25 - 0,37		y = 0,32 – 0,001 x ± 0,06 **	
MCV fl	31,40 - 43,00	33,20 - 44,80	y = 28,69 + 0,53 x ± 5,78	y = 30,49 + 0,53 x ± 5,78
CHCM mmol/l	22,20 - 25,10	21,60 - 24,50	y = 23,18 + 0,03 x ± 1,43	y = 22,58 + 0,03 x ± 1,43
MCHC mmol/l	21,80 - 24,50	22,00 - 24,70	y = 22,50 + 0,05 x ± 1,35	y = 22,17 + 0,05 x ± 1,35
MCH mmol/l	0,70 - 1,00	0,80 - 1,00	y = 0,64 + 0,014 x ± 0,139	y = 0,67 + 0,014 x ± 0,14
RDW %	17,30 - 23,50	16,60 - 22,70	*	*
HDW mmol/l	1,40 – 1,70		***	
PLT G/l	197,50 - 708,50	265,40 - 716,40	y = 647,0 – 14,0 x ± 225,51	y = 714,9 – 14,0 x ± 225,51
MPV f/l	3,60 - 4,50		y = 3,83 + 0,012 x ± 0,46	
MPC g/dl	24,10 - 28,30	23,00 - 27,20	y = 25,0 +0,072 x ± 2,1	y = 23,93 +0,072 x ± 2,1
MPM pg	0,91 - 1,13	0,85 - 1,07	y = 0,92 + 0,006 x ± 0,11	y = 0,86 + 0,006 x ± 0,11
PDW %	49,40 - 89,69	44,28 - 84,60	y = 60,73 + 0,55 x ± 20,16	y = 55,64 + 0,55 x ± 20,16
PCDW g/dl	4,15 - 5,31		***	

[#]Altersgruppe < 24 Monate, * kein Alterseinfluß,** kein Rasseeinfluß,*** kein Alters und Rasseeinfluß

Fortsetzung Tab. 41:

	Referenzbereich beim Alter von 16 Monaten		Formel der Regressionsgeradengleichung zur Berechnung altersabhängiger Referenzbereiche	
Parameter	**Schwarzbunte Holstein**	**Deutsches Fleckvieh**	**Schwarzbunte Holstein**	**Deutsches Fleckvieh**
RetikulozytenG/l*	10,2 –15,2		y = lg(1,16-0,014x ± lg 0,398)**	
WBC G/l	6,34 - 13,90		y = lg(1,02 - 0,003 x ± 0,17)**	
Neutrophile Granulozyten G/l	1,80 - 5,60	1,40 - 4,50	*	
Lymphozyten G/l	4,10 - 9,80		y = lg (0,87 - 0,004 x ± 0,189)	
Monozyten G/l	0,20 - 1,10		y = lg (-0,08 – 0,013 x ± 0,33)	
Eosinophile Granulozyten G/l[#]	0,01 - 1,23	0,05 - 0,94	y = lg (- 0,98 + 0,027 x ± 0,64)	y = lg (-1,10 + 0,027 x ± 0,64)
Basophile Granulozyten G/l	0,06 - 0,21		y = lg (-0,65 – 0,019 x ± 0,28)	
Neutrophile Granulozyten %	11,20 - 37,90	17,20 - 43,90	y = 21,01 - 0,22 x ± 13,32	27,04 – 0,22 x ± 13,32
Lymphozyten %	57,70 - 84,90	54,25 - 81,40	y = 67,91 – 0,21 x ± 13,58	y = 64,47 – 0,21 x ± 13,58
Monozyten % [#]	4,20 - 13,00		y = lg (0,91 – 0,01 x ± 0,25)	
Eosinophile Granulozyten % [#]	4,20 - 13,10	5,60 - 17,30	y = lg (0,98 - 0,027 x ± 0,26)	y = lg (0,98 - 0,027 x ± 0,26)
Basophile Granulozyten %	0,70 — 1,89		y = lg (0,32 – 0,016 x ± 0,22)	

[#]Altersgruppe < 24 Monate, * kein Alterseinfluß,** kein Rasseeinfluß,*** kein Alters und Rasseeinfluß

Tab. 42: Zusammenfassung der Referenzbereiche für Rinder älter 2 Jahre

Parameter	Referenzbereich beim Alter von 6 Jahren		Formel der Regressionsgeradengleichung zur Berechnung altersabhängiger Referenzbereiche	
	Schwarzbunte Holstein	**Deutsches Fleckvieh**	**Schwarzbunte Holstein**	**Deutsches Fleckvieh**
RBC T/l	5,80 - 8,40		***	
HGB mmol/l	5,40 - 8,00		***	
HCT l/l	0,23 - 0,34		***	
MCV fl	35,40 - 47,80		y = 41,35 + 0,05 x ± 6,12 **	
CHCM mmol/l	22,30 - 24,20	22,10 - 23,90	*	*
MCHC mmol/l	21,90 - 24,70	21,60 - 24,40	*	*
MCH mmol/l	0,80 - 1,10		y = 0,97 + 0,001 x ± 0,15 **	
RDW %	17,20 - 22,10		y = 19,73 – 0,022 x ± 2,44**	
HDW mmol/l	1,30 - 1,60		***	
PLT G/l	186,50 - 597,10		***	
MPV f/l	3,60 - 5,00	3,50 - 4,90	*	*
MPC g/dl	24,30 - 28,30	23,60 - 27,70	*	*
MPM pg	0,90 - 1,30	0,84 - 1,14	*	*
PDW %	53,70 - 106,59		***	
PCDW g/dl	4,10 - 5,35		y = 4,69 + 0,006 x ± 0,63	

* kein Alterseinfluß,** kein Rasseeinfluß,*** kein Alters und Rasseeinfluß

Fortsetzung Tab. 42:

Parameter	Referenzbereich beim Alter von 6 Jahren		Formel der Regressionsgeradengleichung zur Berechnung altersabhängiger Referenzbereiche	
	Schwarzbunte Holstein	Deutsches Fleckvieh	Schwarzbunte Holstein	Deutsches Fleckvieh
Retikulozyten G/l*	4,60 - 9,50	3,50 - 8,50	*	*
WBC G/l	6,70 — 15,40	6,00 — 13,70	y = lg (1,02 - 0,002 x ± 0,18)	y = lg (0,97 - 0,002 x ± 0,18)
Neutrophile Granulozyten G/l	1,80 — 5,60	1,40 — 4,50	*	*
Lymphozyten G/l	3,60 — 9,40		lg (0,789 - 0,004 x ± 0,21)**	
Monozyten G/l	0,25 — 0,90	0,20 — 0,70	*	*
Eosinophile Granulozyten G/l #	0,13 — 1,28	0,15 — 1,54	y = lg (- 0,38 - 0,002 x ± 0,50)	y = lg (- 0,30 - 0,002 x ± 0,50)
Basophile Granulozyten G/l	0,05 — 0,23	0,04 — 0,18	y = lg (-0,94 – 0,003 x ± 0,32)	y = lg (-1,05 – 0,003 x ± 0,32)
Neutrophile Granulozyten %	18,50 — 43,80		y = 30,43 - 0,12 x ± 12,65**	
Lymphozyten %	38,50 — 65,10		y = 58,66 – 1,14 x ± 13,31**	
Monozyten % #	2,60 — 7,80		y = lg(0,66 – 0,001 x ± 0,24)**	
Eosinophile Granulozyten % #	0,40 — 3,40		y = lg (0,60 x ± 0,47)**	
Basophile Granulozyten %	0,63 — 1,93		y = lg (0,049 – 0,001 x ± 0,24)**	

* kein Alterseinfluß,** kein Rasseeinfluß,*** kein Alters und Rasseeinfluß

6 SUMMARY

The determination of haematological parameters is part of an elaborate and experienced diagnostic workup of buiatric patients. The analysis of blood samples is more often than not performed with automatic haematology-systems. The laser-based multiparameter system ADVIA 120, firstly developed for the use in the general medicine was adapted to standards on bovine blood samples in co-operation with the manufacturing company BAYER DIAGNOSTICS. With the adaptation of software which was done in four steps, the instrument were parallelly evaluated. Finally, using the ADVIA 120 age-dependent reference-ranges both old and new blood parameters were determined for the cattle breeds Holstein and German Fleckvieh.
The adaptation of software and evaluation were performed with 245 blood samples on both healthy and sick cattle within age range of 1 day to 12 years. The correlation of the results of the ADVIA 120 to these of the refernce analysers Sysmex F-800 and Technicon H*1 is excellent (r>0,96) for the following parameters: WBC, RBC, HGB, MCV, HCT, MCH. Independent from the staining methods the differentiation of blood cells correlates with the results of the manual counting for the neutrophil granulocytes (r>0,95), lymphocytes (r>0,90) and eosinophil granulocytes (r=0,80) from good to very good. The correspondence of the differentiation of the monocytes is in comparison to the α-Naphtylacetateesterase staining method (r=0,51) satisfactory, regarding the basophil granulocytes there is no correspondence to the manual differentiation.

The precision within a serie as well as for different series is excellent (CV<3%) for the parameters WBC, RBC, HGB, MCV, HCT, MCH, MCHC, HDW and RDW. Furthermore, the repetition of the parameters PLT, MPV, PDW and MPC is satisfactory (CV=1,50 – 6,78 %). It is only the repetition of reticulocytecount is only unsatisfactory (CV= 37,87 – 61,20 %). The precision for the differentiation of blood cells is described for neutrophil granulocytes as good (CV<4,98 %). Concerning lymphocytes and monocytes the repetition is poorer (CV=11,13 –31,03%). The counting of eosinophil granulocytes shows for different series a variation coefficient of 31,5 %; this result is caused by the physiological insignificant amount of eosinophile granulocytes in the blood pictures and furthermore by the connected statistical susceptibility for the count of coincidences. Linearity and carry over of the ADVIA 120 were found to be very good for the parameters RBC, WBC, HGB and

good for the parameter PLT. The aging determination of the blood cells from 10 samples shows that the storage time has a greater influence on the keeping quality of bovine blood samples than the storage temperature. The results of the blood count for WBC, RBC, HGB, MCV, MCH can be described as stable at 4 °C for the first 72 hours. The results for platelet count are acceptable until 12 hours after blood taking at a temperature of 22 °C. The storage at room temperature until 12 hours after blood taking does not influence the blood cell differentiation. An adulteration of blood cell differentiation by a longer lasting transport can be avoided by additionally sending a blood smear. When comparing the anticoagulants Li-Heparin, Na-Citrat and K_3-EDTA there is an obvious advantage of K_3-EDTA when using ADVIA 120.

In the second step of the study there were age-dependent reference ranges determined for the bovine breeds black Holstein and German Fleckvieh. Using 432 healthy cattle, K_3-EDTA blood samples were analysed within 5 hours after blood sampling. The measurements were analysed by a non parametrical regression with the help of a local assessed regression-smoothener (S-Plus Version 3.1, Statistical Sciences, Inc.) and were divided into 3 different age groups (<6 months, 6- 24 months, >24 months). For each age group the influence of the breed was determined by a mono-factorial covariance analysis using the software BMDP1V (Dixon, 1993). With the help of the shown formula, it is possible to calculate the individual parametric reference ranges for the age dependent parameters.

$$y(x) = a + b \cdot x \pm t_{1-\alpha/2, n-3} \cdot \sqrt{\frac{n+1}{n}} \cdot s$$

a = Y -intercept of the regression line
b = Slope gradient of the regression line
x = Age in month
t = Value of the student distribution for the bilateral level of probability α with n-3 random samples
α = Preselected bilateral level of probability
n = Number of random samples
s = Standard deviation

The following tables (tables 40 – 42) demonstrate the reference ranges of the age groups <6 months, 6-24 months and >24 months for the bovine breeds Holstein and German Fleckvieh. From the tables the age-dependent parameters can be calculated with the help of the mentioned formula for each age. In the formula of the corresponding age group the variable X must be replaced by the age in months or if

the animals are older than 24 months in years. If there is no difference in the breeds at one parameter the formula is valid for both breeds. Additionally to the formula, there is in the center column for the age-dependent parameters a reference range for the chosen age given. For non age-dependent parameters the reference range is valid exclusively.

tab. 43: Summary of the reference values for cattle < 6 month. The reference values are valid for both breeds.

parameter	Reference value 4 month of age	Formula of the regression line to calculate agedepending reference values.
RBC T/l	8,00 - 11,80	*
HGB mmol/l	6,00 - 8,40	*
HCT l/l	-	-
MCV fl	28,50 - 37,50	$y = 35,75 – 0,70\ x \pm 4,55$
CHCM mmol/l	23,40 - 25,40	$y = 21,0 + 0,36\ x \pm 1,00$
MCHC mmol/l	21,10 - 23,30	$y = 20,99 + 0,29\ x \pm 1,08$
MCH mmol/l	0,70 - 0,80	*
RDW %	17,95 - 22,78	$y = 19,19 +0,29\ x \pm 2,4$
HDW mmol/l	1,40 - 1,70	$y = 1,71 – 0,043\ x \pm 0,16$
retikulocyte G/l *	10,2 - 15,2	$y = \lg (1,16 - 0,014\ x \pm \lg 0,398)$
PLT G/l	154,90 - 943,10	$y = 713 – 41\ x \pm 394,12$
MPV f/l	3,40 - 4,50	*

– see age group: < 24 month, * no age influence

continuation tab. 40:

parameter	Reference value 4 month of age	Formula of the regression line to calculate agedepending reference values.
MPC g/dl	22,70 - 27,10	y = 23,47 + 0,36 x ± 2,20
MPM pg	0,74 - 0,92	y = 0,87 – 0,01 x ± 0,09
PDW %	36,90 - 85,10	*
PCDW g/dl	4,44 - 5,32	*
WBC G/l	6,10 - 14,20	y = lg (0,89 + 0,02 x ± 0,18)
neutrophils G/l	1,10 - 4,80	*
lymphocytes G/l	4,10 - 9,90	y = lg (0,66 + 0,037 x ± 0,19)
monocytes G/l	0,30 - 1,30	y = lg (-0,22 ± 0,33)
eosinophils G/l	-	-
basophils G/l	1,23 - 4,46	y = lg (-0,32 – 0,012 x ± 0,28)
neutrophils %	4,90 - 36,50	y = 32,33 – 2,91 x ±15,78
lymphocytes %	50,80 - 79,00	y = 55,89 + 2,25 x ± 14,07
monocytes % [#]	-	-
eosinophils % [#]	-	-
basophils %	1,25 - 2,85	y = lg (0,34 – 0,009 x ± 0,18)

– see age group: < 24 month, * no influenze by age

tab. 44: Summary of age depending reference values for the age 6 –24 month.

parameter	Reference values at 16 month of age		Formula of the regression line to calculate agedepending reference values.	
	Holstein	German Fleckvieh	Holstein	German Fleckvieh
RBC T/l	6,70 - 10,30	6,20 - 9,80	y = 10,6 – 0,13 x ± 1,8	y = 10,1 – 0,13 x ± 1,8
HGB mmol/l	6,00 - 8,60		***	
**HCT l/l# ** **	0,25 - 0,37		y = 0,32 – 0,001 x ± 0,06 **	
MCV fl	31,40 - 43,00	33,20 - 44,80	y = 28,69 + 0,53 x ± 5,78	y = 30,49 + 0,53 x ± 5,78
CHCM mmol/l	22,20 - 25,10	21,60 - 24,50	y = 23,18 + 0,03 x ± 1,43	y = 22,58 + 0,03 x ± 1,43
MCHC mmol/l	21,80 - 24,50	22,00 - 24,70	y = 22,50 + 0,05 x ± 1,35	y = 22,17 + 0,05 x ± 1,35
MCH mmol/l	0,70 - 1,00	0,80 - 1,00	y = 0,64 + 0,014 x ± 0,139	y = 0,67 + 0,014 x ± 0,14
RDW %	17,30 - 23,50	16,60 - 22,70	*	*
HDW mmol/l	1,40 – 1,70		***	
PLT G/l	197,50 - 708,50	265,40 - 716,40	y = 647,0 – 14,0 x ± 225,51	y = 714,9 – 14,0 x ± 225,51
MPV f/l	3,60 - 4,50		y = 3,83 + 0,012 x ± 0,46	
MPC g/dl	24,10 - 28,30	23,00 - 27,20	y = 25,0 +0,072 x ± 2,1	y = 23,93 +0,072 x ± 2,1
MPM pg	0,91 - 1,13	0,85 - 1,07	y = 0,92 + 0,006 x ± 0,11	y = 0,86 + 0,006 x ± 0,11
PDW %	49,40 - 89,69	44,28 - 84,60	y = 60,73 + 0,55 x ± 20,16	y = 55,64 + 0,55 x ± 20,16
PCDW g/dl	4,15 - 5,31		***	

[#]age < 24 month, * no influence by age,** no influence by breed,*** no influence by age and breed

continuation tab. 41:

parameter	Reference values at 16 month of age		Formula of the regression line to calculate age depending reference values.	
	Holstein	**German Fleckvieh**	**Holstein**	**German Fleckvieh**
retikulocytesG/l*	10,2 –15,2		y = lg(1,16-0,014x ± lg 0,398)**	
WBC G/l	6,34 - 13,90		y = lg(1,02 - 0,003 x ± 0,17)**	
neutrophils G/l	1,80 - 5,60	1,40 - 4,50	*	
lymphocytes G/l	4,10 - 9,80		y = lg (0,87 - 0,004 x ± 0,189)	
monocytes G/l	0,20 - 1,10		y = lg (-0,08 – 0,013 x ± 0,33)	
eosinophils G/l	0,01 - 1,23	0,05 - 0,94	y = lg (- 0,98 + 0,027 x ± 0,64)	y = lg (-1,10 + 0,027 x ± 0,64)
basophils G/l	0,06 - 0,21		y = lg (-0,65 – 0,019 x ± 0,28)	
neutrophils %	11,20 - 37,90	17,20 - 43,90	y = 21,01 - 0,22 x ± 13,32	27,04 – 0,22 x ± 13,32
lymphocytes %	57,70 - 84,90	54,25 - 81,40	y = 67,91 – 0,21 x ± 13,58	y = 64,47 – 0,21 x ± 13,58
monocytes % [#]	4,20 - 13,00		y = lg (0,91 – 0,01 x ± 0,25)	
eosinophils % [#]	4,20 - 13,10	5,60 - 17,30	y = lg (0,98 - 0,027 x ± 0,26)	y = lg (0,98 - 0,027 x ± 0,26)
basophils %	0,70 — 1,89		y = lg (0,32 – 0,016 x ± 0,22)	

[#]age < 24 month, * no influence by age,** no influence by breed,*** no influence by age and breed

Tab. 45: Summary of reference values for cattle > 2 years.

parameter	Reference values at 6 years of age		Formula of the regression line to calculate age depending reference values.	
	Holstein	German Fleckvieh	Holstein	German Fleckvieh
RBC T/l	5,80 - 8,40		***	
HGB mmol/l	5,40 - 8,00		***	
HCT l/l	0,23 - 0,34		***	
MCV fl	35,40 - 47,80		y = 41,35 + 0,05 x ± 6,12 **	
CHCM mmol/l	22,30 - 24,20	22,10 - 23,90	*	*
MCHC mmol/l	21,90 - 24,70	21,60 - 24,40	*	*
MCH mmol/l	0,80 - 1,10		y = 0,97 + 0,001 x ± 0,15 **	
RDW %	17,20 - 22,10		y = 19,73 – 0,022 x ± 2,44**	
HDW mmol/l	1,30 - 1,60		***	
PLT G/l	186,50 - 597,10		***	
MPV f/l	3,60 - 5,00	3,50 - 4,90	*	*
MPC g/dl	24,30 - 28,30	23,60 - 27,70	*	*
MPM pg	0,90 - 1,30	0,84 - 1,14	*	*
PDW %	53,70 - 106,59		***	
PCDW g/dl	4,10 - 5,35		y = 4,69 + 0,006 x ± 0,63	

* no influence by age,** no influence by breed,*** no influence by age and breed

continuation tab. 42:

parameter	Reference values at 6 years of age		Formula of the regression line to calculate age depending reference values.	
	Holstein	German Fleckvieh	Holstein	German Fleckvieh
RetikulocytesG/l*	4,60 - 9,50	3,50 - 8,50	*	*
WBC G/l	6,70 — 15,40	6,00 — 13,70	y = lg (1,02 - 0,002 x ± 0,18)	y = lg (0,97 - 0,002 x ± 0,18)
neutrophils G/l	1,80 — 5,60	1,40 — 4,50	*	*
Lymphocytes G/l	3,60 — 9,40		lg (0,789 - 0,004 x ± 0,21)**	
monocytes G/l	0,25 — 0,90	0,20 — 0,70	*	*
Eosinophils G/l	0,13 — 1,28	0,15 — 1,54	y = lg (- 0,38 - 0,002 x ± 0,50)	y = lg (- 0,30 - 0,002 x ± 0,50)
basophils G/l	0,05 — 0,23	0,04 — 0,18	y = lg (-0,94 – 0,003 x ± 0,32)	y = lg (-1,05 – 0,003 x ± 0,32)
neutrophils %	18,50 — 43,80		y = 30,43 - 0,12 x ± 12,65**	
lymphocytes %	38,50 — 65,10		y = 58,66 – 1,14 x ± 13,31**	
monocytes % [#]	2,60 — 7,80		y = lg(0,66 – 0,001 x ± 0,24)**	
eosinophils % [#]	0,40 — 3,40		y = lg (0,60 x ± 0,47)**	
basophils %	0,63 — 1,93		y = lg (0,049 – 0,001 x ± 0,24)**	

* no influence by age,** no influence by breed,*** no influence by age and breed

7 SCHRIFTTUMVERZEICHNIS

ACKERMANN, H. (1983):
Sind x±2s-Bereiche nützliche Diagnostische Hilfsmittel?
Med. Welt 34(7), 212-215

AHNADI, C.E.,CHAPMAN, E.S., OKRONGLY D. HOANG, T., LUCENA-FERNANDES, F., GRANT, A.M. (2001)
Evaluation of Platelet Activation in Patients with Chest Pain by the ADVIA 120 Hematology System
http://mmserver.cjp.com/gems/blood/PlateletActivation.pdf

AMAKIRI, S.F.; NGERE, L.O.; OLUSANYA, S.K.; IKEDE, B.O. (1979):
Crossbreeding of Exotic and Indigenous Cattle in Nigeria - Haematological Correlates
Trop. Anim. Health Prod. 11, 106-112

AMMELOUNX, B. (1980):
Hochgradige Blutarmut beim Kalb infolge von massivem Läusebefall
Tierärztl. Umschau 35, 692-696

ANOSA, V.O.; LOGAN-HENFREY, L.L.; SHAW, M.K. (1992):
A Light and Electron Microscopic Study of Changes in Blood and Bone Marrow in acute Hemorrhagic Trypanosoma vivax Infection in Calves
Vet. Pathol. 29, 33-45

BACCUS, J. (1973):
The Observer Error in Peripheral Blood Cell Classification
Am. J. Clin. Path. 59, 223-230

BARNETT, C.W. (1933):
The Unavoidable Error in the Differential Count of the Leucocytes of the Blood
J. Clin. Invest. 12, 77-85

BAYER CORPORATION (1999):
ADVIA 120 Hematology System Multi-Species(TM) System Software Version 1.1.07-MS Supplemental Operating Information
Bayer Customer Bulletin, Publication No. TN9-9219-00

BEDDIES, G. (1999):
Erstellung hämatologischer Referenzwerte mit dem für die Tierart Schaf etablierten Hämatologiesystem Technicon H*1
Vet. med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen

BERKSON, J. D.; MAGATH, T. B.; HURN, M. (1940):
The Error of Estimate of Blood Cell Count as Made with the Hemocytometer
Am. J. Physiol. 128, 309-323

BGBl.1997 I 3328, 3329
Kälberhaltungsverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 22.12.97

BLEUL, U. (1998):
Hämatologische Verlaufsuntersuchungen bei Rindern intra und post partum - gleichzeitig eine Überprüfung des Hämatologiesystems CellDyn 3500(R)
Vet. med. Diss., Gießen

BOLLINGER, P.B.; DREWINKO, B.; BRAILAS, C.D.; SMEETON, N.A.; TRUJILLO, J.M. (1987):
The Technicon H*1-an Automated Hematology Analyzer for Today and Tomorrow. Complete Blood Count Parameters
Am. J. Clin. Path., 87, 71-78

BOROVICZENY, K.-G.V. (1991):
Entwicklung der Blutzellanalytik
In: Boll, Irene and Heller, Silke: Praktische Blutzelldiagnostik,
INSTAND Schriftenreihe Band 7, Springer.Verlag Berlin Heidelberg, 1-4

BOSTEDT, H.; BERCHTOLD, M. (1968):
Veränderungen der Glucose-Konzentration und der Zahl der eosinophilen Leukozyten im Blut von Rindern intra und post partum
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 81, 243-245

BUSCH, B. (1965):
Blutuntersuchungen an weiblichen Kälbern im Zeitraum vom 8. bis 99. Lebenstag. 1. Mitteilung: Die Entwicklung der morphologischen Blutwerte
Mh. Vet. Med. 20, 545-550

CHAPMAN, D. (2001)
Case Study: Large Platelets in a Trauma Patient
http://www.bloodline.net/Stories/storyReader$2568

COLE, DJ.; ROUSSEL AJ.; WHITNEY,MS. (1997):
Interpreting a Bovine CBC: Evaluating the leukon and acute-phase proteins
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 5, 470-478

CORAPI, W.V.; ELLIOTT, R.D.; FRENCH, T.W.; ARTHUR, D. G.; BEZEK, D. M.; DUBOVI, E. J. (1990):
Thrombocytopenia and Hemorrhages in Veal Calves infected with Bovine Viral Diarrhea Virus
J. Am. Vet. Med. Assoc., 196, 590-596

DAVIES, D. T.; FISHER, G.V. (1991):
The Validation and Application of the Technicon H*1 for the Automated Evaluation of Laboratory Animal Haematology
Comp. Haematol. Intern. 1, 91-105

DIN 58931 (1995):
Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut, Referenzmethode
Deutsches Institut für Normung e. V, 1-4

DIN 58932-1 (1996):
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut, Teil 1: Blutentnahme, Probenvorbereitung, Einflußgrößen, Störfaktoren
Deutsches Institut für Normung e.V, 1-2

DIN 58932-2 (1998):
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut, Teil 2: Kennzeichnende Größen für Erythrozyten (Erythrozytenindices)
Deutsches Institut für Normung e.V, 1-2

DIN 58932-3 (1994):
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut, Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten, Referenzmethode
Deutsches Institut für Normung e. V, 1-5

DIN 58933-1 (1995):
Bestimmung des Volumenanteils der Erythrozyten im Blut, Teil 1: Zentrifugationsmethode als Referenzmethode
Deutsches Institut für Normung e. V, 1-3

DIN 58934-1 (1997):
Kontrollmaterialien für das Blutbild, Teil 1: Kontrollblute
Deutsches Institut für Normung e. V, 1-3

DIXON, W.J. (1993):
BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2
University of California Press, Berkley, Los Angeles, London

DOLL, K. (1991):
Hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungsbefunde bei Kälbern und Jungrindern mit Ileus
Tierärztl. Praxis, 19, 44-47

DOORNENBAL, H. (1977):
Physiological and Endocrine Parameters in Beef Cattle: Breed, Sex and Year Differences
Can. J. Comp. Med. 41, 13-18

DOTSON, M. A. (1998):
Multiparameter Hematology Instruments.
In: Stiene-Martin, E. A., Lotspeich-Steininger, C. A. and Koepke, J. A.:
Clinical Hematology
Lippincott, Philadelphia, 519-551

DÖRNER, K.; SCHULZE, S.; REINHARDT, M.A. (1993):
Erste Evaluationsergebnisse mit dem Hämatologiesystem Cell-Dyn 3500
Klin. Lab. 39, 39-44

DUFFIELD, PEREGRINE, SMITH (2000):
Hematology Reference Intervals
http://www.uoguelph.ca/ahl/UsersGuide/19_HEMATOLOGY_REF_INTERVALS.htm

EDER, H. (1987):
Scheunert/Trautmann(Hrsg.): Lehrbuch der Veterinär-Physiologie
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

EDER, H.; FRITSCHE, H.A. (1986):
Automatisation in der hämatologischen Diagnostik: Entwicklungsstand der Geräte zum Zählen und Differenzieren von Blutzellen
Tierärztl. Praxis 14, 417-429

EISENSMITH, S. P.(1994):
PlotIT for Windows. Scientific Programming
Enterprises, Haslett, MI 48840 USA

ENGLAND, J.M.; ROWAN, R.M.; VAN ASSENDELFT, O.W.; BULL, B.S.; COULTER, W. H.; FUJIMOTO, K.; GRONER, W.; JONES, A.R.; KOEPKE, J.A.; LEWIS, S.M.; SHINTON, N.K.; TATSUMI, N.; THOM, R.; VERWILGHEN, R.L.; MCLAREN, C.E. (1994):
Guidelines for the Evaluation of Blood Cell Analysers Including Those Used for Differential Leucocyte and Reticulocyte Counting and Cell Marker Applications
Clin. Lab. Haematol. 16 (2), 157-174

GOLDSTON, R.T.; WILKES, R.D.; SEYBOLD, I.M. (1980):
The Basic Clinical Pathology Laboratory-4
Vet. Med. Small Anim. Clin. 4, 586-590

GOOSSENS, W.; VAN-HOVE, L.; VERWILGHEN, R.L. (1991):
Monocyte Counting: Discrepancies in Results Obtained with Different Automated Instruments
J. Clin. Path. 44, 224-227

GREATOREX, J.C. (1975):
Observation on the Hematology of Calves and Various Breeds of Adult Dairy Cattle
Br. Vet. J. 113, 469-481

GROMMELT, P. (1999):
Automatisierte Blutzellzählung und Differenzierung mit dem Hämatologiesystem Technicon H*1 beim Rind
Vet. med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen

GROSS, R.; WICHMANN, H.E.A. (1979):
Was ist eigentlich Normal?
Med. Welt, 30(1), 4-14

HABERMANN, J.; PATZ, S.A. (1989):
Monozyten: Mikroskop vs. cytochemisch, cytometrische, automatisierte Bestimmung
Extr. Diag.,3, 108-111

HALLMANN, L. (1980):
Untersuchung von Blut und Sternalpunktat
In: Klinische Chemie und Mikroskopie
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

HAYASHI,T; YAMANE,O.; SAKAI,M. (1976):
Hematological and Pathological Observations of Chronic Furazolidone Poisoning in Calves
Nippon. Juigaku. Zasshi, 38, 225-223

HEWETT, C. (1974):
On the Causes and Effects of Variations in the Blood Profile of Swedish Dairy Cattle
Acta Vet. Scand. Suppl. (50) 1-152

HOFMANN, W. (1972):
Hämorrhagische Diathese beim Kalb infolge chronischer Furazilidon-Vergiftung
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 79, 289-312

IFCC; ISCH (1987):
Approved Recommendation (1986) on the Theory of Reference Values, Part 1. The Concept of Reference Values
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 25, 337-342

IFCC (1983):
The theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 749-760

JAIN, N.C. (1986):
The Cattle: Normal Hematology with Comments on Response to Disease
In Schalm (Ed.) Veterinary Hematology,
Lea Febiger, Philadelphia 4th Edition, 178 -207

JAIN, N.C. (1993):
Essentials of Veterinary Hematology
Lea & Febiger, Philadelphia

KERSHAW, G.W.; ROBIN, H.; KRONENBERG, H. (1987):
Evaluation of the Technicon H-1 Hematology Analyser
Pathology 19, 305-309

KLEE, W.; SCHILLINGER, D.; DIRKSEN, G. (1979):
Blutharnstoff und Hämatokritwert bei der Kälberdiarrhoe - diagnostische und prognostische Bedeutung
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 86, 457-512

KOEPPEN, K.-M.; HELLER, S. (1991):
Zelldifferenzierung
In: Boll, I. und Heller, S.(Hrsg.): Praktische Blutzelldiagnostik.
INSTAND Schriftenreihe 7 Springer-Verlag,162-187

KOSANKE, W. (1999):
Laserstreulicht und Peroxidasefärbung als Grundlagen zur Erstellung des Blutbildes und der Retikulozytenanalytik
In: Bruhn, H. D. und Fölsch, U. R.: Lehrbuch der Labormedizin,
Schattauer Verlag, Stuttgart, 403-410

KRAFT, W. (1967):
Das Blutbild des Kalbes in den ersten zehn Lebenstagen
Dtsch. Tierärztl. Wschr.74 (8), 194-197

KRAFT, W.; DÜRR, U.M.; FÜRLL, M.; BOSTEDT, H.; HEINRITZI, K. (1999):
Hämatologie.
In: Kraft, W. und Dürr (Hrsg.): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin,
Schattauer Verlag, Stuttgart, 43-77.

LORENZ, R.J. (1996):
Grundbegriffe der Biometrie
Gustav Fischer Verlag Stuttgart

LÖSCH, U.C.J.; ERHARD, M.H.; KASPERS, B. (2000):
Blut und Abwehr
In: Engelhardt, W.v.; Breves, G. (Hrsg.) Physiologie der Haustiere
Enke Verlag Stuttgard, 190-216

LUMSDEN, J.H.; ET, A. (1974):
The Piromen Test as an Assay of Bone Marrow Granulocyte Reserves in the Calf.
I. Studies on Bone Marrow and Peripheral Blood Leukocytes.
Can. J. Comp. Path. 35, 38

Macey, M.G.; Carty, E.; Webb, L.; Chapman, E.S.; Zelmanovic, D.; Okrongly, D.; Rampton, D.S.; Newland, A.C. (1999):
Use of Mean Platelet Component to Measure Platelet Activation on the ADVIA 120 Haematology System.
Cytometry 38, 250 – 255

MAMMERICKX, M.; LORENZ, R.J.; STRAUB, O.C.; DONNELLY, W.J.; FLENSBURG, J.C.; GENTILE, G.; MARKSON, L.M.; RESSANG, A.A.; TAYLOR, S.M. (1978)
Bovine hematology. III. Comparative Breed Studies on the Leukocyte Parameter of Several European Cattle Breeds as Determined in the Common Reference Laboratory.
Zbl. Vet. Med. [B] 25(4), 257-267

MAMMERICKX, M.; LORENZ, R.J.; STRAUB, O.C.; DONNELLY, W.J.; FLENSBURG, J.C.; GENTILE, G.; MARKSON, L.M.; RESSANG, A.A.; TAYLOR, S.M. (1978)
Bovine hematology. IV. Comparative Breed Studies on the Erythrocyte Parameters of 16 European Cattle Breeds as Determined in the Common Reference Laboratory
Zbl. Vet. Med. [B]. 25(6), 484-498

MANOIU,J.; MAY,J.; MARSCHANG,A.; POP,P.; COSTEA,V.
Pathogenese und Therapie von Erkrankungen des Intestinaltraktes bei Kälbern.
Arch. Exp. Veterinärmed. 27(3),527-541

MORITZ, A. (2000):
Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin
Vetmed. Habilitation, Justus-Liebig-Universität Gießen

NIEPAGE, H. (1974):
Methoden der praktischen Hämatologie für Tierärzte
Paul Parey Verlag., Berlin und Hamburg

NOONAN, T.R.; CROSS, F.H.; REYNOLDS, R.A.; MURPHREE, R.L. (1978):
Effects of Age, Season and Reproductive Activity on Hemograms of Female Hereford Cattle
Am. J. Vet. Res., 39, 433-440

OGAWA, E.; KOBAYASHI, K.; YOSHIURA, N.; MUKAI, J. (1989):
Hemolytic Anemia and red Blood Cell Metabolic Disorder attributable to low Phosphorus intake in Cows
Am. J. Vet. Res. 50, 388-392

PAAPE, M. J.; CARROLL, D. W.; KRAL, A. J.; MILLER, R. H.; DESJARDINS, C. (1974):
Corticosteroids, circulating Leukocytes and Erythrocytes in Cattle: Diurnal changes and Effects of Bacteriologic Status, Stage of Lactation, and Milk yield on Response to Adrenocorticotropin
Am. J. Vet. Res. 35, 355-362

POMSEL, T. (1980):
Hämatologische Normalwerte beim Rind in Abhängigkeit von Alter und Trächtigkeit
Eine Auswertung der Literatur
Vet. med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen

RÜMKE, C.L. (1960):
Die Zelldifferenzierung in Blutausstrichen: Variabilität der Ergebnisse
Triangle 4, 154-158

RÜMKE, C. L.; BEZEMER, P. D.; KUIK, D. J. A. (1975):
Normal Values and Least Significant Differences for Differential Leucocyte Counts
J. Chron. Dis. 28, 661-668

RYAN, G. M. (1971):
Blood Values in Cows: Erythrocytes
Res. Vet. Sci. 12, 572-575

RYAN, G. M. (1971):
Blood Values in Cows: Leukocytes
Res. Vet. Sci. 12, 576-578

SACHS, L. (1992):
Angewandte Statistik, Anwendung Statistischer Methoden
Springer Verlag

SCARBOROUGH, R.A. (1932):
The Blood Picture of Normal Laboratory Animals
Yale J. Biol. Med. 4, 69-70

SCHALM, O.W. (1999):
Manual of Bovine Hematology
Lea & Febiger, Philadelphia

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CAROLL (1975):
Normal Values in Blood Morphology
In Schalm (Hrsg.) Veterinary Hematology
Lea & Febiger Philadelphia 152-156.

SCHLERKA,G.; BAUMGARTNER, W. (1983):
Labordiagnostik in der Klauentierpraxis,
Die hämatologische Untersuchung
Tierärztl. Umschau 38, 273-285

SEEGERS, M. (1997):
Einsatzfähigkeit des Technicon H*1 in der hämatologischen Diagnostik beim Pferd
Vetmed Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen

STEINHARDT, M.; THIELSCHER, H.-H.; HORN, V.T.; HORN, V.R.; ERMGASSEN, K.; LADEWIG, J.; SMIDT, D. (1994):
Bemerkungen zur Hämoglobinkonzentration des Blutes bei Milchrindern verschiedener Rassen und ihren Nachkommen im peripartalen Zeitraum.
Tierärztl. Praxis 22(2), 129-135

STOBBE, H. (1991):
Analyte des Kleinen Blutbildes
In: Boll, I. and Heller, S. (Hrsg.): Praktische Blutzelldiagnostik,
INSTAND Schriftenreihe Band 7, Springer.Verlag Berlin Heidelberg, 44-89

STÖBER, M.; GRÜNDER, H.D. (1990):
Kreislauf
In: Rosenberger, G.(Hrsg.): Die klinische Untersuchung des Rindes
Verlag Paul Parey, Berlin, 194-233

TENNANT, B.; HARROLD, D.; REINA, G M.; KENDRICK, J W.; LABEN, RC. (1974):
Hematology of the Neonatal Calf: Erythrocyte and Leukocyte Values of normal Calves
Cornell Vet. 64, 516-532

THOM, R. (1990):
Meßtechniken in der Hämatologie und vergleichende Bewertung von hämatologie-Analysatoren. Aus Trends in der Hämatologie INSTAND-Symposium 1988 Berlin
TOA MEDICAL ELECTRONICS (EUROPE) GMBH, Hamburg, 63-76

THOMAS, L. (1998):
Labor und Diagnose
TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt

UNDRITZ, E. (1972):
Hämatologische Tafeln 2. Aufl.
Sandoz AG, Nürnberg

VON RÜCKER, A.; HENKEL, E.; HAECKEL, R.; DIEM, H.; GUNZER, H.; MÜLLER, H.A.G.; NEBE, T.; WEBER, R.; JÖNSSON, D.; HELLER, S.; BRÜGGEMANN, M.; FINK, P.; KALOUS, J.; KATZ, N.; KUTZNER, M.; LENZ, T.; LIPS, H.; MÜLLLER, W.; PICK, K.H.; PINTO, G.; PROHASKA, W.; RAFFAEL, A.; REINECKE, T.; ROTHE, G.; RUBY, C.; SACHSE, C.; SEEGER, H.T.; SCHMITZ, G.; SCHNEIDER, W.; STOBRAWA, F.; VAN WERSCH, J.W.J.; ZIERVOGEL, H. (1994):
Evaluationsprotokoll für hämatologische Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräte
Klinische Chemie Mitteilungen, 25, 272-286

WATT,JG. (1967):
Fluid Therapy for Dehydration in Calves
J. Am. Vet. Med. Assoc.,150(7), 742-750

WEBER, R. (1992):
Meßprinzipien in der Hämatologie
MTA Extra, 16, 4-24

WEISS,D.J.; PERMAN,V. (1992):
Assesssment of the Hematopoietic System in Ruminants
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 8, 411-428

WENZ, B.; RAMIREZ, M.A. (1987):
The H*1 Hematology Analyzer
Arch. Path. Lab. Med. 111, 521-524

WESTGARD, J. O.; CAREY, R. N.; WOLD, S. (1974):
Criteria for Judging Precision and Accuracy in Method Development and Evaluation
Clin. Chem. 20, 825-833

ZELMANOVIC, D.; GARCIA, R.A.; TURRELL, J. (1992):
Automated Instrumentation (Haematology)
aus: Kirk.-Othmer. Encyclopedia of Chemical Technology, 4th Edition,772-787

ZIEGLER, A. (1997):
Die Automatische Blutzelldifferenzierung mit den Hämatologiesystemen Microx 70 und Technicon H*1 beim Hund
Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen

8 DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Doktorvätern Herrn Prof. Dr. K. Doll und HDoz. Dr. A. Moritz für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation bedanken.

Mein besonderer Dank gilt:
HDoz. Dr. A. Moritz, der durch seine Kompetenz und seine Fähigkeit jederzeit motivierend Einfluß zu nehmen, entscheidend an der Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Allen Landwirten, die durch Ihre tatkräftige Mithilfe und geduldige Bereitschaft zur Auskunft über Betriebs- und Tierdaten, die Probenentnahme zu einem angenehmen Teil der Arbeit gemacht haben. Dies sind besonders die Familien Aberle, Haupt, Kley, Kehm, Krusen-Holsteg, Michel, Schadek, Stein, Weil, sowie die Administratoren der Versuchsgüter Rauischholzhausen und Marienborn.

Dr. K. Failing, Herrn Heiter und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biomathematik, die durch die statistische Aufbereitung der enormen Datenmengen diese Arbeit erst durchführbar gemacht haben.

Den Laborteams der Rinderklinik (Frau Brigitte Neeb-Sonntag, Frau Dagmar Bartkowiec und Frau Gisela Dapper) und der Kleintierklinik, die durch Tips und Hilfe die Ausführung der Arbeit erheblich erleichtert haben.

Den Mitarbeitern der Firma Bayer Diagnostics (Herr Kosanke, Herr Schraml und Herr Schweitzer stellvertretend für den technischen Not- Beratungsdienst), die in Fällen von technischen Problemen und Computerabstürzen schnell und zu jeder Zeit klärende Hilfe boten.

Nicht zuletzt meiner Freundin, meiner Familie und Freunden, die entweder durch Hilfe bei der Erstellung der Arbeit oder durch Hilfe bei der Wiederherstellung meiner Moral eine unersetzliche Hilfe waren.
Vielen Dank an Andreas, Marie-Therese, Christian, Susu, Kati, Rütger, Marie-Louise, Kirsten, Bernhard, Ralph und meine Mutter Ingrid Holsteg.